



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS**

ANDRÉ DE BARROS ALBUQUERQUE ESTEVES

**AVALIAÇÃO DOS PRODUTOS FINAIS DA GLICAÇÃO AVANÇADA (AGEs)
MEDIDOS POR AUTOFLUORESCÊNCIA DA PELE E SUA ASSOCIAÇÃO COM
DOENÇA CARDIOVASCULAR E DISTÚRBO MINERAL ÓSSEO EM PACIENTES
COM DOENÇA RENAL CRÔNICA CATEGORIAS 3 E 4**

CAMPINAS

2017

ANDRÉ DE BARROS ALBUQUERQUE ESTEVES

**AVALIAÇÃO DOS PRODUTOS FINAIS DA GLICAÇÃO AVANÇADA (AGEs)
MEDIDOS POR AUTOFLUORESCÊNCIA DA PELE E SUA ASSOCIAÇÃO COM
DOENÇA CARDIOVASCULAR E DISTÚRBO MINERAL ÓSSEO EM PACIENTES
COM DOENÇA RENAL CRÔNICA CATEGORIAS 3 E 4**

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Médicas da
Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos
para obtenção do título de Mestre em Ciências, na área de Clínica Médica

ORIENTADOR: PROF. DR. RODRIGO BUENO DE OLIVEIRA

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO DE
MESTRADO DEFENDIDA PELO ALUNO ANDRÉ DE BARROS ALBUQUERQUE
ESTEVES E ORIENTADO PELO PROF. DR. RODRIGO BUENO DE OLIVEIRA.

CAMPINAS

2017

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas
Ana Paula de Moraes e Oliveira - CRB 8/8985

Es85a Esteves, Andre de Barros Albuquerque, 1983-
Avaliação dos produtos finais da glicação avançada (AGEs) medidos por autofluorescência da pele e sua associação com doença cardiovascular e distúrbio mineral e ósseo em pacientes com doença renal crônica categorias 3 e 4 / Andre de Barros Albuquerque Esteves. – Campinas, SP : [s.n.], 2017.

Orientador: Rodrigo Bueno de Oliveira.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Doença renal crônica. 2. Produtos finais da glicação avançada. 3. Hormônio paratireóide. 4. Distúrbio mineral e ósseo na doença renal crônica. I. Oliveira, Rodrigo Bueno de, 1975-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Evaluation of advanced glycation end products (AGEs) measure by skin autofluorescence and its relations with cardiovascular disease and chronic kidney disease mineral and bone disorder in ckd patients categories 3-4

Palavras-chave em inglês:

Chronic kidney disease
Advanced glycation end products
Parathyroid hormone
Chronic kidney disease-mineral and bone disorder

Área de concentração: Clínica Médica

Títuloção: Mestre em Ciências

Banca examinadora:

Rodrigo Bueno de Oliveira [Orientador]
Melani Ribeiro Custódio
José Antônio Rocha Gontijo

Data de defesa: 19-12-2017

Programa de Pós-Graduação: Clínica Médica

BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE MESTRADO
ANDRÉ DE BARROS ALBUQUERQUE ESTEVES

ORIENTADOR: PROF. DR. RODRIGO BUENO DE OLIVEIRA

MEMBROS:

1. PROF. DR. RODRIGO BUENO DE OLIVEIRA

2. PROFA. DRA. MELANI RIBEIRO CUSTÓDIO

3. PROF. DR. JOSÉ ANTÔNIO ROCHA GONTIJO

Programa de Pós-Graduação, área de concentração de Clínica Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

A ata de defesa com as respectivas assinaturas dos membros da banca examinadora encontra-se no processo de vida acadêmica do aluno.

Data: 19 de dezembro de 2017

DEDICATÓRIA

Aos meus queridos pais Nelson e Bernadete, com toda minha gratidão, por tudo que fizeram por mim ao longo da vida. Pelos valores que me ensinaram e pelo incentivo constante aos estudos.

À minha amada esposa Cristiane, companheira de todas as horas, pelo amor e apoio incondicional em todas as etapas desta obra.

À minha filha Fernanda que mesmo tão pequena em sua vida intrauterina me fez perceber sentimentos nobres e únicos do ser humano.

EPIGRAFE

“A mente que se abre a uma nova ideia jamais voltará ao seu tamanho original”.

(Albert Einstein)

AGRADECIMENTOS

À Deus, que me deu força e coragem diante das adversidades iluminando meus caminhos nesta jornada.

Ao professor Dr. Rodrigo Bueno de Oliveira, pelo aprendizado, incentivo e apoio incessante no desenvolvimento deste projeto.

Às minhas amigas Kélcia e Renata. Pessoas especiais que compartilharam e me ajudaram a superar as dificuldades da pós-graduação.

À equipe de enfermagem do Centro Integrado de Nefrologia, pelo suporte técnico e organização dos pacientes do estudo.

À equipe médica do Ambulatório de Uremia da UNICAMP que me recebeu carinhosamente e permitiu o contato e seleção dos participantes.

Aos pacientes, por entenderem que do seu esforço e solidariedade outras pessoas poderiam ser beneficiadas.

RESUMO

INTRODUÇÃO: A doença renal crônica (DRC) apresenta elevadas taxas de morbidade e mortalidade, sendo a doença cardiovascular (DCV) e o distúrbio mineral e ósseo (DMO) complicações frequentes. Os produtos finais da glicação avançada (AGEs) são toxinas urêmicas associadas a DCV e possivelmente ao DMO-DRC. Seu acúmulo tecidual pode ser indiretamente estimado através do instrumento AGE-ReaderTM, por meio da quantificação da intensidade da autofluorescência da pele (sAF). A metodologia encontra-se validada em pacientes com DRC. **OBJETIVOS:** Avaliar as relações entre os níveis teciduais cutâneos, séricos, ósseos e o consumo dietético de AGEs totais e frações com parâmetros clínicos, bioquímicos e de imagem relativos à DCV e de DMO em pacientes com DRC categorias 3 e 4. **MÉTODOS:** Estudo clínico observacional, transversal no qual foram incluídos 26 pacientes em tratamento conservador (grupo DRC) a partir do Hospital de Clínicas da UNICAMP; 59 indivíduos hígidos (Grupo Controle) foram incluídos para comparação. Foram coletados dados demográficos, clínicos e laboratoriais, e realizados leitura da sAF, aferição do índice tornozelo-braquial (ITB) por ultrassonografia Doppler, e registro alimentar para quantificação de consumo de AGEs totais, carboximetil-lisina (CML) e metilglioxal (MG). O Grupo DRC realizou exames de imagem (radiografias de quadril, mãos e abdome lateral, ecocardiograma transtorácico e densitometria óssea), dosagem sérica de CML, análise histomorfométrica semi-quantitativa do tecido ósseo e análise de AGEs do osso cortical pela técnica da imunoperoxidase a partir de amostra obtida por meio de biópsia óssea de crista ilíaca. **RESULTADOS:** Os níveis de AGEs-sAF foram elevados para a idade nos grupos DRC e Controle, porém mais elevados no primeiro (3,15 UA vs. 2,33 UA; $p < 0,001$). Não houve diferença entre a ingestão dietética de AGEs totais e suas frações entre os grupos. No grupo DRC, AGEs-sAF se correlacionaram negativamente com a taxa de filtração glomerular (TFG). Níveis mais elevados de AGEs-sAF foram encontrados no subgrupo DRC categoria 4 quando comparados ao subgrupo DRC categoria 3. A pontuação do escore de Framingham do grupo DRC, septo interventricular e pressão arterial sistólica se correlacionaram positivamente com a intensidade de AGEs-sAF. Pacientes com calcificação vascular (CV) presente apresentaram níveis maiores de AGEs-sAF comparados aos pacientes sem CV. A maioria dos pacientes submetidos a biópsia óssea foi diagnosticada com osteíte fibrosa (9; 75%). Houve correlação positiva entre a intensidade dos AGEs-sAF e os níveis séricos de PTHi. Do mesmo modo, a concentração de AGEs na camada de osso cortical se correlacionou positivamente com a intensidade de AGEs-sAF, PTHi, fosfato, e inversamente a TFG. **CONCLUSÕES:** A deposição de AGEs na pele e osso cortical foi elevada em pacientes com DRC categorias 3-4, apresentando uma correlação positiva. Aparentemente tal acúmulo independe do consumo dietético e não está relacionado com níveis séricos de CML. A deposição de AGEs em osso cortical também se correlacionou com os níveis séricos de PTHi e P. Além disso, observamos correlações de AGEs-sAF com parâmetros reconhecidos de DCV, como septo interventricular, pressão arterial sistólica, presença de CV e escore de Framingham. Estudos futuros são necessários para elucidar a natureza dessas associações.

Palavras-chave: doença renal crônica; produtos finais da glicação avançada; hormônio da paratireoide; doenças cardiovasculares; distúrbio mineral e ósseo.

ABSTRACT

INTRODUCTION: Chronic kidney disease (CKD) is associated with high morbidity and mortality rates, main causes related with cardiovascular disease (CVD) and bone mineral disorder (CKD- BMD). Advanced glycation end-products (AGEs) are uremic toxins that play a role on development of CVD and CKD-BMD. Its tissue accumulation can be indirectly estimated through the AGE-Reader TM instrument by quantifying the intensity of autofluorescence of the skin (sAF). The methodology is validated in CKD patients. **AIMS:** Evaluate in CKD categories 3 and 4 patients the relationships among AGEs detected via sAF, serum, bone and dietary intake, and metabolic and structural parameters of bone and cardiovascular disease, including vascular calcification (VC) evaluation. **METHODS:** A cross-sectional, observational clinical study in which 26 patients on conservative treatment (CKD Group) were included from the Hospital de Clínicas da UNICAMP; 59 healthy subjects (Control Group) were included for comparison. Demographic, clinical and laboratory data were collected. All subjects performed biochemical tests, ankle-brachial index (ABI) measurement by Doppler ultrasound, AGEs-sAF and quantification of dietary AGEs, carboxymethyl-lysine (CML) and methylglyoxal (MG) intakes by three-day dietary record. CKD Group underwent hip, hands and lateral abdominal x-rays; transthoracic echocardiography; bone densitometry; serum CML; semi-quantitative bone histomorphometric analysis and a cortical bone AGEs analysis using the immunoperoxidase technique obtained by bone biopsy sample. **RESULTS:** AGEs-sAF levels were elevated according to age in both HD and Control groups, however were higher in CKD patients (3.15 AU vs. 2.33 AU, $p < 0.001$). On the other hand, there was no difference between the total AGEs intake and their analyzed fractions between the groups. In the CKD group, AGEs-sAF correlated negatively with glomerular filtration rate. Higher levels of AGEs-sAF were found in the CKD category 4 subgroup when compared to the CKD category 3 subgroup. The Framingham score, interventricular septum and systolic blood pressure positively correlated with the AGEs-sAF intensity. Patients who had vascular calcification (VC) presented higher levels of AGEs-sAF than patients without VC. The majority of patients submitted to bone biopsy were diagnosed with osteitis fibrosa ($n = 9$; 75%). There was a positive correlation between AGEs-sAF and PTHi. Likewise, the cortical bone AGEs correlated positively with AGEs-sAF, PTHi, phosphate and inversely to GFR. **CONCLUSION:** The deposition of AGEs in skin and cortical bone is elevated in patients with stage 3-4 CKD, presenting a positive correlation. Apparently such accumulation is independent of dietary intake and is not related to serum levels of CML. The deposition of AGEs in cortical bone also correlated with the serum levels of PTHi and P. In addition, we observed correlations of AGEs-sAF with recognized parameters of CVD, such as interventricular septum, systolic blood pressure, CV presence, and Framingham score. Future studies are needed to elucidate the nature of these associations.

Keywords: chronic kidney disease; advanced glycation end products; parathyroid hormone; cardiovascular diseases; mineral and bone disorder.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AF	Autofluorescência
AGEs	Produtos finais da glicação avançada (do inglês, <i>Advanced Glycation End-products</i>)
AGEs-R1	Receptor oligossacaril transferase-48
AGEs-R2	Receptor fosfoproteína 80 K-H
AGEs-R3	Receptor galectina-3
AGEs-sAF	AGEs da pele medidos por autofluorescência da pele
ALEs	Produtos finais da lipoxidação avançada (do inglês, <i>Advanced lipoxidation end-products</i>)
AVE	Acidente vascular encefálico
CA	Circunferência abdominal
CIN	Centro Integrado de Nefrologia
CKD-EPI	<i>Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration</i>
CML	Carboximetil-lisina
CQ	Circunferência de quadril
CV	Calcificação vascular
DAOP	Doença arterial obstrutiva periférica
DCV	Doença cardiovascular
DM	Diabetes <i>mellitus</i>
DMO	Distúrbio mineral-ósseo
DOA	Doença óssea adinâmica
DRC	Doença renal crônica
DXA	Densitometria óssea por raios X de dupla energia
ELISA	Imunoensaio enzimático
FE	Fração de ejeção
HC	Hospital das Clínicas
HD	Hemodiálise
HDL	Lipoproteína de alta densidade (do inglês, <i>High-density lipoprotein</i>)
IAM	Infarto agudo do miocárdio
IMC	Índice de massa corporal
ITB	Índice tornozelo-braquial
KDIGO	<i>Kidney Disease: Improving Global Outcomes</i>

KU	Quilo unidade
LDL	Lipoproteína de baixa densidade (do inglês, <i>Low-density lipoprotein</i>)
MG	Metilglioxal
NA	Não se aplica
OF	Osteíte fibrosa
PAS	Pressão arterial sistólica
PCR	Proteína-C reativa
PTH	Hormônio da paratireoide
PTHi	Hormônio intacto da paratireoide
RAGE	Receptor de AGEs
RCQ	Relação cintura-quadril
RCV	Risco cardiovascular
Rx	Radiografia
sAF	Autofluorescência da pele
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
TFG	Taxa de filtração glomerular
TIBC	Capacidade total de ligação do ferro à transferrina (do inglês, <i>Total iron binding capacity</i>)
TMV	<i>Turnover</i> (Remodelação) - Mineralização - Volume
UA	Unidades arbitrárias
UNICAMP	Universidade Estadual de Campinas
VHS	Velocidade de hemossedimentação

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
®	Marca registrada
±	Mais ou menos
<	Menor
>	Maior
cm	Centímetros
DP	Média mais ou menos desvio padrão
g	Gramas
mg/dL	Miligramas por decilitro
mL	Mililitros
mmHg	Milímetros de mercúrio
ng/mL	Nanogramas por mililitro
P	Significância estatística
pg/mL	Picogramas por mililitro
™	Marca comercial (do inglês “ <i>Trade Mark</i> ”)

SUMÁRIO

1. Introdução	14
2. Metodologia	19
2.1. <i>Desenho do estudo e população</i>	19
2.2. <i>Dados clínicos, demográficos e laboratoriais</i>	20
2.3. <i>Medidas antropométricas</i>	20
2.4. <i>Exames de imagem</i>	21
2.5. <i>Medida de AGEs na pele</i>	22
2.6. <i>Avaliação nutricional</i>	23
2.7. <i>Biópsia óssea</i>	24
2.8. <i>Imunoperoxidase</i>	25
2.9. <i>Análise estatística</i>	26
3. Resultados	27
4. Discussão	40
5. Conclusões	42
6. Referências	43
7. Anexos	51
7.1. <i>Anexo I: Parecer Consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa</i>	51
7.2. <i>Anexo II: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido</i>	57
7.3. <i>Anexo III: Artigo publicado</i>	60
7.4. <i>Anexo IV: Artigo submetido para publicação</i>	69

1. INTRODUÇÃO

A doença renal crônica (DRC) é definida pela presença de dano ou diminuição da função renal por três ou mais meses, independentemente da causa (1). Nos EUA, a prevalência das categorias 3 a 4 da DRC (taxa de filtração glomerular de 15 a 59 mL/min/1,73 m²) aumentou de 4,8% no período de 1988 a 1994 para 6,9% da população e manteve-se estável neste patamar nos anos de 2011 a 2012 (2). Os pacientes com DRC, frequentemente, possuem numerosos fatores de risco tradicionais e não tradicionais para o desenvolvimento de doença cardiovascular (DCV) e distúrbio mineral e ósseo (DMO).

Fatores de risco tradicionais, como hipertensão arterial sistêmica (HAS), tabagismo, diabetes mellitus (DM), dislipidemia e idade avançada são altamente prevalentes em populações de DRC e parecem estar relacionados ao aumento do risco absoluto nos estágios iniciais da doença (3-6). Nos estágios mais avançados da DRC, os fatores não tradicionais e únicos a esta condição incluem a retenção de toxinas urêmicas, anemia, níveis elevados de citocinas inflamatórias e o DMO (7).

Os produtos finais de glicação avançada [*advanced glycation end products*, (AGEs)] são toxinas urêmicas aparentemente envolvidas na fisiopatologia da DCV e do DMO-DRC, embora por mecanismos não completamente esclarecidos. AGEs podem ser gerados em indivíduos saudáveis de forma lenta, acumulando-se com a idade. Entretanto, essas toxinas se encontram em níveis elevados em portadores de DRC devido à redução da sua excreção e ao aumento na sua produção estimulada pelo stress oxidativo. O aumento do stress glicêmico nos portadores de DM contribui para maiores níveis de AGEs no plasma e nos tecidos. AGEs se acumulam mesmo em pacientes urêmicos não-diabéticos de maneira inversamente proporcional a taxa de filtração glomerular (TFG). Também são derivados de fonte exógena, como alimentos processados a altas temperaturas (8).

A formação dos AGEs ocorre a partir de reações não-enzimáticas entre açúcares redutores ou lipídios oxidados e proteínas, aminofosfolipídeos ou ácidos nucleicos (9). A via clássica de Maillard, também denominada glicação, se inicia com a formação de uma base de Schiff instável, através da reação entre um grupo carbonila de um açúcar redutor e um grupo amina. Em seguida, a base de Schiff sofre rearranjos e origina o produto de Amadori, estrutura mais estável, porém ainda reversível, conhecida como produto inicial da via de Maillard. O produto de Amadori (por exemplo, a hemoglobina glicosilada e a frutossamina) possui grupos carbonilos que reagem com grupos aminas, sofrendo um processo lento de rearranjo estrutural para assim formar os AGEs (9,10).

A via alternativa, ou do estresse carbonílico, ocorre através da oxidação de lipídeos e açúcares, gerando produtos que também podem ser denominados produtos finais da lipoxidação (ALEs) ou da glicoxidação avançada, respectivamente. Esta via se inicia com a formação de compostos dicarbonílicos ou oxaldeídos altamente reativos, como por exemplo o metilglioxal (MG) e o glioxal, que interagem com aminoácidos para originar os AGEs (Figura 1) (9,10).

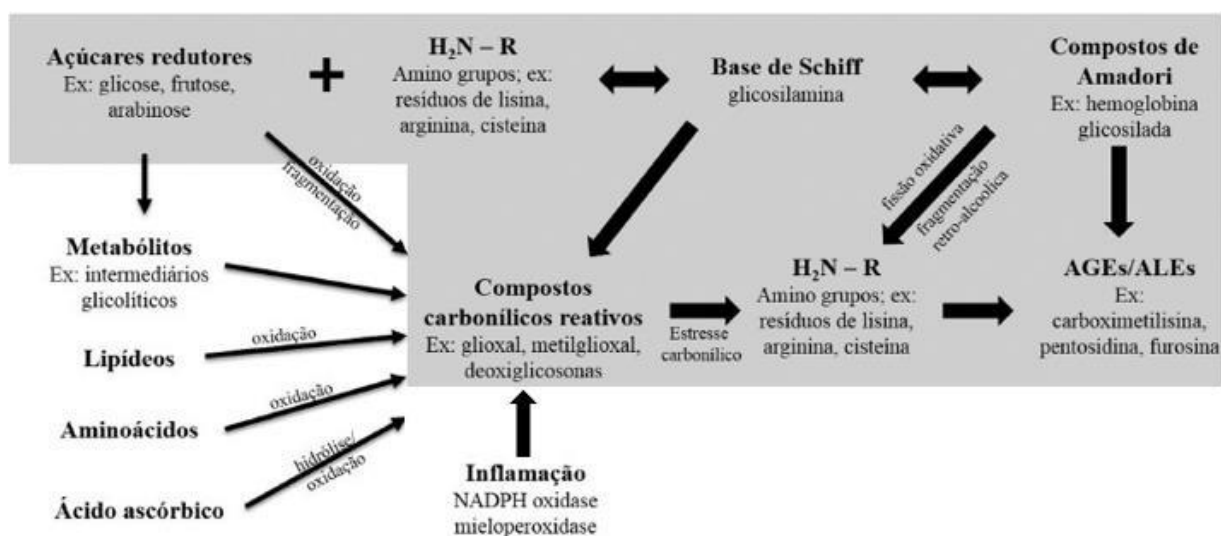


Figura 1. Vias de formação de AGEs e ALEs (11). AGEs, produtos finais da glicação avançada; ALEs, produtos finais da lipoxidação avançada

Por outro lado, o organismo é capaz de ativar sistemas enzimáticos para atenuar a formação endógena de AGEs que incluem agentes que atuam na detoxificação de intermediários dicarbonílicos reativos, como a oxaldeído redutase e a aldose redutase, e enzimas que interrompem as reações de glicação em diferentes estágios, como glioxilase I e II, a frutosamina-3-cinase e a frutosamina oxidase (12). Já a remoção dos AGEs formados nos componentes teciduais é realizada pela proteólise extracelular ou pelas células *scavenger*, como os macrófagos, que endocitam AGEs via receptores e, após a degradação intracelular, liberam na circulação AGE-peptídeos solúveis e de baixo peso molecular, para serem excretados com a urina (13).

Os AGEs apresentam diversos tipos de receptores, sendo o principal representante deste grupo o receptor de AGEs (RAGEs), responsável pelo início da sinalização intracelular pró-inflamatória que desencadeia a ativação e translocação do fator de transcrição nuclear kappa B. Além disso, existem receptores que atuam na *clearance* e detoxificação dos AGEs, como os receptores *scavenger* classe A, tipos I e II: o receptor oligossacaril transferase-48 (AGE-R1); a fosfoproteína 80 K-H (AGE-R2); e a galectina-3 (AGE-R3) (14).

Especula-se que o acúmulo de AGEs em pacientes com DRC interfira negativamente sobre a sistema cardiovascular induzindo disfunção endotelial, rigidez arterial, formação de placas ateroscleróticas e calcificação vascular (CV) (15,16). Um dos mecanismos propostos seria a ligação dos AGEs aos RAGEs no colágeno e elastina da matriz dos vasos sanguíneos, alterando a regulação vasomotora do endotélio, adesão de plaquetas, e induzindo proliferação celular e formação de radicais oxidativos (17).

O envolvimento dos AGEs na aterosclerose já foi sugerido tanto pela detecção de AGEs no interior das placas de ateroma, quanto pela inibição de formação destas placas após instituição de terapia para redução de AGEs e bloqueio dos RAGEs (18,19). Existe evidência clínica de associação entre os níveis séricos de pentosidina (PEN) e de AGEs totais com valores de índice tornozelo-braquial (ITB) $\leq 0,9$, utilizados para diagnóstico de doença arterial obstrutiva periférica (DAOP) (20). Além disso, já se demonstrou níveis de AGEs na pele mais elevados em portadores de DAOP, diagnosticados através do ITB (21). Mesmo em indivíduos autorreferidos hígidos, os níveis séricos mais elevados de PEN se correlacionam com ITB entre 0,9 a 1,1, podendo significar DAOP latente (22).

Já com relação ao papel dos AGEs no desenvolvimento de CV, existem até o presente momento somente estudos *ex-vivo* que demonstram a expressão de AGEs em sítios de vasos calcificados, através de imunohistoquímica, e a capacidade dos AGEs de induzirem a diferenciação das células musculares lisas em células osteoblasto-like (15,23,24). Esta diferenciação ocorre a partir da interação dos AGEs com os RAGEs, promovendo a expressão de proteínas específicas do tecido ósseo como a fosfatase alcalina e a osteocalcina (23,24).

Os AGEs também exerceriam influência na fisiopatologia do desenvolvimento de insuficiência cardíaca sistólica. Estas toxinas são capazes de induzir fibrose cardíaca através de ativação de fibroblastos cardíacos por meio dos RAGEs, além de reduzir a concentração de cálcio intracelular em cardiomiócitos e acelerar a progressão de coronariopatia (25-27).

A geração de AGEs é um processo contínuo e inevitável *in vivo* sendo seu acúmulo e dano resultante mais evidente em tecidos de baixo *turnover* (28,8). Deste modo, proteínas com tempo de meia-vida elevada, como o colágeno, tem maior propensão de serem glicadas. O Colágeno tipo I é o principal fator determinante da rigidez óssea por ser um importante componente proteico da matriz do osso. As fibras de colágeno são formadas a partir da conexão entre as moléculas de colágeno através de *crosslinks* em posições geneticamente determinadas por meio de enzimas específicas, como a lisina hidroxilase e a lisil oxidase (29-31). Estes *crosslinks* enzimáticos contribuem para a melhoria da resistência do tecido ósseo com o aumento da rigidez do colágeno (32-33). Por outro lado, *crosslinks* não-enzimáticos de

colágeno ocorrem como um processo de glicação constante. PEN e carboximetil-lisina (CML) são AGEs bem reconhecidos que possuem resíduos de lisina e arginina. Estes aminoácidos também presentes nas fibras colágenas do tecido ósseo, acabam sendo utilizadas como substâncias precursoras da formação desses AGEs (34). Portanto, ao contrário da formação de *crosslinks* enzimáticos, os *crosslinks* não enzimáticos pelos AGEs prejudicam a resistência óssea.

Diversos estudos *ex vivo* obtidos de amostras humanas indicam que a PEN contida em diversas partes de diferentes ossos do corpo são inversamente associadas a capacidade de tensão final e a resistência a fratura (35-38).

Os efeitos dos AGEs sobre a fragilidade óssea são mais evidentes em pacientes diabéticos do que em pacientes não diabéticos. Amostras de biópsia do osso ilíaco de pacientes com DM tipo 1 mostraram níveis significativamente maiores de PEN nos indivíduos com fratura quando comparados aos pacientes sem fratura (39). Em outro estudo, a resistência óssea em pacientes com DM tipo 2 foi inferior ao grupo sem DM e inversamente associado aos AGEs da pele (40).

Estudos clínicos de indivíduos sem DM mostraram que pacientes com fratura de fêmur apresentaram níveis ósseos de AGEs maiores que o grupo sem fratura além de uma relação de níveis séricos de CML ao risco de fratura de quadril (41-43).

Níveis elevados de AGEs também são encontrados no tecido ósseo de pacientes com osteoporose. Altos valores de AGEs plasmáticos foram associados ao comprometimento da formação óssea e fator de risco para o desenvolvimento de osteoporose em mulheres na pós-menopausa (44).

AGEs podem regular a proliferação e diferenciação dos osteoblastos. RAGE na presença de AGEs, é capaz de provocar em osteoblastos, a ativação do fator nuclear kappa-B resultando no aumento da expressão de citocinas, fatores de crescimento e moléculas de adesão (45,46). Em outros experimentos, AGEs suprimiram a mineralização das células do estroma ST2 de ratos e inibiram parcialmente a diferenciação dos osteoblastos por meio da ligação de RAGE e aumento da expressão e secreção de TGF- β (47).

Portanto, o acúmulo de AGEs no osso tem sido associado a uma redução de propriedades biomecânicas cortical e trabecular e com comprometimento funcional das células ósseas (48-50).

Especula-se se intervenções dietéticas, medicamentosas ou dialíticas podem ter efeito sobre o nível sérico e impregnação dos tecidos por AGEs, com impacto benéfico dessa modulação sobre o sistema cardiovascular e tecido ósseo (8,51-55). Qualquer intervenção

terapêutica em relação aos AGEs em tese necessitaria da quantificação do seu nível sérico ou tecidual ao longo do tempo.

Recentemente, foi desenvolvida e validada uma técnica não invasiva para quantificar indiretamente a deposição de AGEs tecidual, através da medição da autofluorescência da pele (sAF) (AGE-Reader™) (56,57). O método foi validado com biópsias de pele de pacientes com DM, DRC e controles saudáveis (56-58). A sAF é elevada em pacientes com DM e DRC, e está associada com maior mortalidade cardiovascular, independente de fatores de risco conhecidos para DCV (57-59). A medida de AGEs pela sAF também parece estar correlacionada com desfecho cardiovascular em pacientes em hemodiálise (HD) (60).

A quantificação dos AGEs nos tecidos pode ser preferível em relação ao plasma, uma vez que se acumulam nos tecidos e os níveis plasmáticos podem não refletir os níveis teciduais (9). Apesar dos níveis séricos de AGEs estarem aumentados nos pacientes com DRC, a sAF se qualifica como um melhor marcador de dano tecidual (8). sAF e a correlação entre PEN com a espessura média-íntimal da carótida foram inversamente associadas a células endoteliais progenitoras capazes de reparar o dano cardiovascular (61,62). Porém, em análise de regressão múltipla, somente a sAF foi relacionada às células endoteliais progenitoras (61). Da mesma forma, somente a sAF e não o AGEs plasmático se mostrou fortemente associada a disfunção miocárdica diastólica (63).

McIntyre *et al* (64), em uma coorte de 1.707 pacientes DRC categoria 3, observou a associação entre vários fatores de risco cardiovascular (RCV) e renal com a sAF.

A sAF em outros estudos tende a ser associada a fatores de risco de mortalidade cardiovascular ou a evidência direta de dano cardiovascular como a correlação positiva com a espessura média-intimal da artéria carótida (65).

No entanto, nenhum destes estudos avaliou simultaneamente AGEs por diferentes metodologias, como sAF, níveis séricos e ingestão dietética, e suas associações com DMO e DCV, em pacientes DRC categorias 3 e 4. O presente estudo se propôs a investigar estas possíveis associações entre AGEs avaliados indiretamente por sAF, consumo dietético, níveis séricos de CML, acúmulo de AGEs no osso cortical e suas interações com parâmetros de DMO e marcadores de DCV em uma população de pacientes em tratamento conservador de DRC categorias 3 e 4.

2. METODOLOGIA

2.1. Desenho do estudo e população

Este foi um estudo clínico observacional transversal, controlado que incluiu um “Grupo DRC” composto por 26 pacientes provenientes do ambulatório de uremia no Centro Integrado de Nefrologia (CIN) do Serviço de Nefrologia da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) e um “Grupo Controle” constituído por 59 voluntários autorreferidos como hígidos. O recrutamento dos participantes e a coleta de dados ocorreram no período de agosto de 2015 a novembro de 2017.

O estudo foi aprovado pelo comitê de ética do HC-UNICAMP através da Plataforma Brasil (CAAE: 45777015.5.0000.5404) (Anexo I). O termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) por escrito foi fornecido a todos os participantes (Anexo II).

Foram incluídos no estudo pacientes em acompanhamento ambulatorial classificados como DRC categorias 3 e 4 conforme o *Kidney Disease Outcomes Quality Initiative - KDIGO* (taxa de filtração glomerular - TFG - estimada entre 15 e 59 mL/min por em duas ou mais ocasiões num intervalo de pelo menos 3 meses) utilizando-se a equação CKD-EPI (*Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration*) (1, 66), com idade > 20 anos e que assinaram o TCLE. Os critérios de exclusão foram: cor da pele que não permita o uso do AGE-Reader™ (de acordo com informação do fabricante, peles dos fototipos “V” e “VI” da classificação de Fitzpatrick (67), neoplasia avançada, doença infecciosa ou inflamatória crônica grave, doença terminal com expectativa de vida menor que 1 ano, icterícia, história prévia de transplante de órgão e gestação.

O grupo controle foi composto por pessoas que se autorreferiram como hígidas, de diferentes faixas etárias definidas pelos seguintes critérios: (1) idade entre 20 a 70 anos; (2) creatinina sérica $\leq 1,2$ mg/dL; (3) albumina $> 3,5$ mg/dL; (4) não-diabéticos; (5) ausência de doença inflamatória crônica; (6) não-gestantes (mulheres); (7) fototipos de pele “I” a “IV” da classificação de Fitzpatrick, que permitiam o uso do AGE-Reader™; (8) não fazer uso de qualquer medicação conhecida por influência no metabolismo ósseo (suplementação de cálcio, vitamina D e análogos, anticonvulsivantes, bisfosfonatos, calcitonina, corticosteróides, análogos do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH), heparina, dicumarínico, terapia de reposição hormonal, hormônios tireoidianos).

2.2. *Dados clínicos, demográficos e laboratoriais*

Os dados clínicos e demográficos foram coletados a partir de anamnese e revisão de prontuário e incluíram: idade, gênero, raça, fototipo de pele, etiologia da DRC, tabagismo atual ou prévio, comorbidades, medicações em uso e história de eventos cardiovasculares, como insuficiência arterial periférica, acidente vascular encefálico (AVE), aneurisma de aorta, dissecação de aorta, angina e infarto agudo do miocárdio (IAM).

Amostras de sangue foram coletadas em jejum em datas pré-agendadas. As dosagens séricas de creatinina, uréia, sódio, potássio, hemoglobina, hematócrito, cálcio, fosfato, ferro, ferritina, saturação de transferrina, capacidade total de ligação do ferro à transferrina (TIBC), glicemia de jejum, hemoglobina glicada, colesterol total e frações, triglicérides, ácido úrico, relação albumina-creatinina em amostra de urina, proteína-C reativa (PCR), velocidade de hemossedimentação (VHS) e albumina foram determinadas usando métodos laboratoriais automatizados padrões dos laboratórios de bioquímica HC-UNICAMP (Sistema modular IIPR, Roche Diagnostics, Basel, Suíça). A concentração sérica de 25-hidroxivitamina D foi determinada pelo método de quimiluminescência. Somente o Grupo DRC realizou dosagens séricas de bicarbonato, β 2-microglobulina, alumínio, fosfatase alcalina, hormônio intacto da paratireoide (PTHi), através de ensaio imunoenzimático por quimiluminescência (Liaison N-tact PTH CLIAR, Diasorin, Stillwater) e com valores de referência de 15-65 pg/mL, além de dosagem sérica de CML a partir de kit ELISA fornecido pela empresa Shanghai Blue Gene Biotech CO., LTD. (E01C0773) e executado conforme instruções do fabricante, apresentando faixa de detecção entre 5-100 ng/mL e sensibilidade $> 1,0$ ng/mL.

Dados clínicos e laboratoriais como idade, níveis séricos de HDL e colesterol total, pressão arterial, história de DM e tabagismo foram utilizados para classificação de risco cardiovascular (RCV) através do score de Framingham (68). As possíveis classificações foram: RCV baixo, intermediário ou elevado.

2.3. *Medidas antropométricas*

As medidas de massa corporal e altura foram realizadas em posição ortostática, sem sapatos ou roupas pesadas, registrados em quilogramas (Kg) e centímetros (cm) respectivamente. A partir dessas medidas, foi calculado o índice de massa corporal (IMC) utilizando a seguinte fórmula: peso, em quilogramas, dividido pela estatura, em metros ao quadrado (Kg/m^2). A circunferência abdominal (CA) foi obtida em posição ortostática, no ponto médio entre o último arco costal e a crista ilíaca. Já a circunferência de quadril (CQ) foi aferida no maior diâmetro do quadril, passando pelos trocânteres maiores. Ambas foram registradas

em cm e utilizadas para o cálculo da relação cintura-quadril (RCQ) - CA (cm) dividida pela CQ (cm).

As pressões arteriais sistólicas para o cálculo do índice tornozelo-braquial (ITB) foram aferidas nos membros superiores, artérias braquiais, e nos membros inferiores, artérias pediosas e tibiais posteriores, após 5 minutos de repouso em decúbito dorsal. Manguitos padrão para aferição de pressão arterial foram aplicados e a localização das artérias se deu através de palpação e, em seguida, foram aplicados gel para ultrassom e o aparelho de Doppler vascular (10 MHz, MEDMEGA Indústria de Equipamentos Médicos LTDA., Franca, Brasil). O ITB foi obtido pela divisão simples da maior PAS obtida em cada artéria do membro inferior pela maior PAS obtida nos membros superiores. Os valores de referência são: ITB anormal $\leq 0,90$, associado à doença vascular obstrutiva periférica, e $\geq 1,40$, sugestivo de rigidez vascular devido à calcificação vascular (CV); ITB normal = 0,91 a 1,39 (69).

2.4. Exames de imagem

O grupo DRC realizou radiografias de quadril e mãos em incidência pósterio-anterior, assim como de abdome lateral ou coluna lombar lateral para pesquisa de CV. Para o cálculo do escore de Adragao, a radiografia de pelve foi dividida em quatro seções a partir de duas linhas imaginárias: uma horizontal, através do limite superior das cabeças dos fêmures, e outra vertical, acima da coluna vertebral. Já a radiografia das mãos foi dividida, para cada mão, através de uma linha horizontal que delimita a parte superior dos ossos do metacarpo. A presença de CV em cada seção corresponde a 1 ponto no escore, enquanto sua ausência a 0. O escore final se dá pela soma dos pontos de cada seção, variando de 0 a 8. Somente CV linear nas artérias ilíacas, femorais, radiais e digitais foi considerada neste escore (70).

A partir das radiografias de abdome lateral foi avaliada a CV de aorta abdominal, utilizando o escore de Kauppila. O segmento da aorta abdominal localizado de L1-L4 foi subdividido em paredes anterior e posterior e a extensão longitudinal do vaso numerada de 1 a 4 de acordo com a vértebra adjacente. Cada segmento, anterior e posterior, recebeu uma pontuação de 0 a 3: 0 significa ausência de calcificação; 1 representa pequeno depósito calcificado que ocupa menos de um terço de toda a parede; 2 indica calcificação maior do que um terço, porém menor do que dois terços da parede; e 3 significa que dois terços ou mais da parede do vaso está calcificada. O escore varia de 0 a 24 pontos (71).

A densidade mineral óssea foi avaliada em portadores de DRC em ossos da coluna lombar e fêmur, ou em toda massa óssea corporal, utilizando a densitometria óssea por raios-X de dupla energia (DXA). Os resultados foram expressos em desvio-padrão em relação ao adulto

jovem (*T-score*) e desvio-padrão em relação a pessoas da mesma faixa etária (*Z-score*), e classificados de acordo com os critérios definidos pela Organização Mundial de Saúde: (a) normal: *T-score* de até -1,0 DP; (b) osteopenia: *T-score* entre -1,0 e -2,5 DP; (c) osteoporose: *T-score* menor ou igual a -2,5 DP (72).

Ecocardiograma transtorácico foi realizado no grupo DRC para complementar análise cardiovascular, tendo sido avaliados os seguintes parâmetros: massa de ventrículo esquerdo (gramas), diâmetro de átrio esquerdo (mm), espessura de septo interventricular (mm), e fração de ejeção (%).

2.5. Medida de AGEs na pele

A deposição de AGEs na pele foi avaliada indiretamente pela medida da sAF na região do antebraço esquerdo ou do membro superior contralateral ao do acesso vascular para HD, usando o aparelho AGE-ReaderTM (DiagnOptics, Groningen, Holanda). Os valores de AGEs por AF da pele (AGEs-sAF) foram expressos em unidades arbitrárias (UA). Três leituras consecutivas foram tomadas, sendo utilizada a média aritmética simples dos três valores para classificação, de acordo com valores de referência para a idade descritos por Koetsier *et al* (73) (Tabela 1), e em grupos de RCV. Pacientes foram divididos em 4 grupos: sem RCV (grupo normal), com AGEs iguais ou menores à média de referência para a idade; RCV discretamente aumentado (grupo 1), nos quais os AGEs estavam acima da média até 1 DP; RCV aumentado (grupo 2), com AGEs acima de 1 DP; e extremamente aumentado (grupo 3), em pacientes cujos valores de AGEs estavam acima de 2,9 UA (Figura 1) (73). Áreas da pele tatuadas, sardentas ou com vasos próximos à superfície de leitura foram evitadas. De acordo com o fabricante, o AGE-ReaderTM e seu *software* foram validados em pacientes com índice de reflexão de pele acima de 6% (Fitzpatrick classe de I a IV) (67,74).

Tabela 1. Valores de referência dos AGEs, medidos por AF da pele, de acordo com a idade em população de indivíduos holandeses (73).

Faixa etária (anos)	AF	N	p
0 – 10	0,97 ± 0,17	45	< 0,01
10 – 20	1,11 ± 0,20	50	< 0,01
20 – 30	1,53 ± 0,30	62	< 0,01
30 – 40	1,73 ± 0,42	86	0,21
40 – 50	1,81 ± 0,36	72	< 0,01
50 – 60	2,09 ± 0,36	64	< 0,01
60 – 70	2,46 ± 0,57	45	0,12
70 – 80	2,73 ± 0,55	27	0,51
80 +	2,71 ± 0,44	5	

Os dados são valores médios de autofluorescência (AF) de pele em unidade arbitrária (UA). Significância entre as faixas etárias é indicada pelos valores de *P*, a partir do teste t Student.

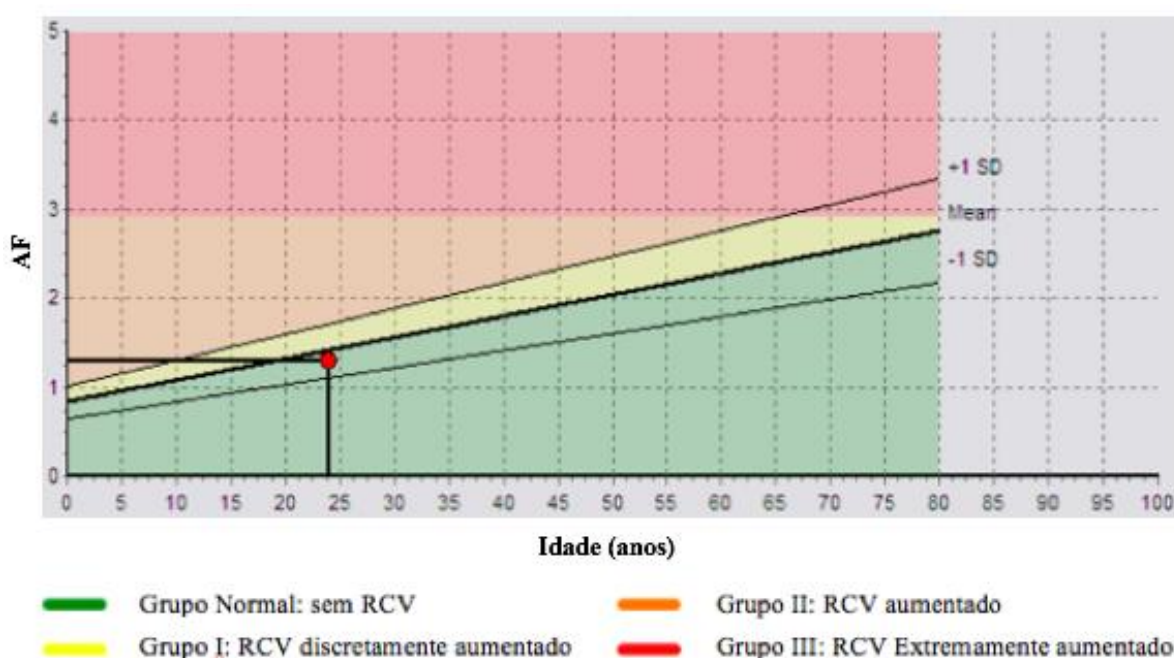


Figura 1. Classificação de risco cardiovascular de acordo com os níveis de AGEs na pele, medidos por sAF, e idade em população de indivíduos holandeses (73). AF, Autofluorescência de pele; RCV, risco cardiovascular.

2.6. Avaliação nutricional

Os pacientes preencheram um registro alimentar durante três dias consecutivos e os conteúdos dietéticos de AGEs totais e as frações de AGEs CML, expressos em quilo unidades (KU), e de metilglioxal, em nano moles (nm), foram calculados de acordo com tabela de conteúdo de AGEs em 549 alimentos descrita no estudo de Uribarri *et al* (disponível online a partir de [http://www.andjrn.org/article/S0002-8223\(10\)00238-5/abstract](http://www.andjrn.org/article/S0002-8223(10)00238-5/abstract)) (75). Devido ao fato de alguns itens da dieta brasileira não apresentarem quantificação equivalente de AGEs, foram analisadas a quantidade e porcentagem de calorias ingeridas de alimentos nos quais o conteúdo

de AGEs era conhecido. Demais nutrientes também foram quantificados: energia – em quilo calorias (Kcal); proteína, lipídeos, carboidratos e fibra – em gramas (g); e cálcio, fosfato, potássio, sódio e colesterol – em miligramas (mg).

2.7. *Biópsia óssea*

A biópsia óssea transilíaca foi realizada sob anestesia local com lidocaína 5% e sedação superficial com midazolam intramuscular ou midazolam e fentanil por via intravenosa. Uma incisão de dois centímetros foi realizada a cerca de 2 cm posterior à espinha ilíaca anterossuperior e 2 cm inferior à crista ilíaca. Em seguida, o tecido subcutâneo e muscular foram divulsionados, e introduzido guia. Utilizando uma serra cilíndrica estéril (trefina), marca Rochester (Rochester, MN, USA), de 7,5 mm de diâmetro e com o auxílio de uma furadeira elétrica o fragmento de tecido ósseo era obtido. A fim de avaliar a mineralização óssea, os pacientes receberam ciclos de tetraciclina para marcação do tecido ósseo (20 mg/Kg/dia durante três dias consecutivos em dois períodos distintos separados por 10 dias). O procedimento ocorreu no período entre o terceiro e o quinto dias após o término do segundo ciclo de tetraciclina. O fragmento ósseo foi considerado adequado com a presença de osso trabecular e duas corticais (interna e externa). As amostras de tecido ósseo calcificado foram conservadas em álcool 70% e infiltradas com metilmetacrilato para análise semi-quantitativa no Laboratório de Fisiopatologia Renal do Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo. Os laudos seguem as terminologias recomendadas pelo *Kidney Disease Improving Global Outcomes (KDIGO)*, por meio da classificação TMV: “T” [*Turnover* (Remodelação)] avaliada como alta, normal ou baixa; , “M” [*Mineralization* (Mineralização)], que se encontra normal ou anormal; e “V” [*Volume* (Volume)], este variando entre aumentado, normal e diminuído (76). Para fins de análise de dados considerou-se o laudo descritivo onde foi possível categorizar os pacientes de acordo com os seguintes diagnósticos do tipo de osteodistrofia renal: doença óssea adinâmica; osteomalácia; doença óssea mista; osteíte fibrosa. Cada paciente também foi categorizado de acordo com a presença ou ausência de osteoporose (diminuição do volume ósseo), intoxicação por alumínio (presença de alumínio recobrindo mais que 20% da superfície óssea) ou deposição de ferro (em cruzes, de um a três).

2.8. *Imunoperoxidase*

A técnica de imunoperoxidase foi desenvolvida após o material conservado em álcool 70° passar por procedimentos de descalcificação. Posteriormente, o material foi desidratado em soluções com concentração crescente de álcool (80%, 90%, 95% e 100%), diafanizado em xilol e embebido em paraplast (Sigma-Aldrich®) para a inclusão e formação dos blocos. Os blocos foram então seccionados em cortes histológicos seriados de 5 µm de espessura que foram produzidos em micrótomo rotativo e posicionados em lâminas previamente tratadas com solução de triethoxyl-silane (Sigma-Aldrich®). Em seguida, as lâminas contendo os cortes histológicos foram desparafinizadas (banhos de xilol e álcool-xilol) e hidratadas (banhos em soluções com concentração decrescente de álcool e água destilada). A seguir, foi realizado o bloqueio da peroxidase endógena com solução contendo 90 ml de Metanol e 10 mL de peróxido de hidrogênio por 10 minutos em câmara escura. O bloqueio de ligações inespecíficas deu-se pela incubação com leite em pó desnatado a 1% por uma hora em temperatura ambiente. Então as lâminas foram incubadas com anticorpo primário Anti-AGEs (ab23722, Abcam®) na concentração de 1:5.000, diluído em PBS/BSA 1%, *overnight*, em câmara úmida a 4°C. Os cortes foram lavados com PBS 0,1 M, pH 7,4 e incubados com o anticorpo secundário biotilado (na concentração de 1:200) diluído em PBS/BSA 1% por uma hora e posterior incubação com Kit ABC (1:50) por 30 minutos. A revelação foi desenvolvida com o kit DAKO (25 µL DAB + 1 mL de substrato) à temperatura ambiente por dois minutos. A seguir, os cortes foram contra corados com hematoxilina, desidratados em soluções alcoólicas, diafanizados em xilol e montados com Entellan® (Merck, Alemanha) para adesão das lamínulas.

Para análise, foi realizada a captura das imagens em foto microscópio acoplado a um computador usando o software CellSens®, no aumento de 200x. Foram obtidas fotos da região cortical em toda a sua extensão. Durante a análise, foi realizada a quantificação da porcentagem marcada em cada uma das fotos e a seguir a média geral de porcentagem em cada uma das biópsias ósseas dos pacientes.

2.9. Análise estatística

Os resultados foram expressos em médias e DP ou medianas e intervalos interquartis para variáveis contínuas, ou em frequências e porcentagens para variáveis categóricas. A normalidade das variáveis contínuas foi avaliada através do teste de Kolmogorov-Smirnov. Comparações entre porcentagens foram feitas utilizando os testes de qui-quadrado para variáveis categóricas, e t-Student ou Mann-Whitney para variáveis contínuas. Correlações entre os AGEs da pele e consumo de AGEs na dieta com parâmetros clínicos e bioquímicos foram feitos usando os coeficientes de Spearman e Pearson. Uma regressão univariada e uma regressão linear multivariada (método *stepwise*) foram realizadas para identificar as variáveis correlacionadas com a espessura do septo interventricular. As variáveis testadas no modelo foram Idade, tabagismo, DM, IMC, ITB, TFG, níveis de AGEs-sAF, fosfatase alcalina sérica, CML, fosfato, PTHi, DMO, ingestão de AGEs total e ingestão de CML. Valores de P bicaudal < 0.05 foram considerados estatisticamente significativos. Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa SPSS (versão 17.0, SPSS Inc., Chicago, EUA).

3. RESULTADOS

Durante o período de 28 meses foram incluídos no estudo 26 pacientes portadores de DRC estágios 3 e 4 em tratamento conservador. Com o intuito de ampliar a compreensão da aplicação do aparelho AGE-Reader™ em população de brasileiros sem DRC realizamos também leituras dos AGEs-sAF em um grupo de 59 pessoas autodeclaradas como híidas (Grupo Controle). Apresentamos os resultados do Grupo Controle e, posteriormente, do Grupo DRC.

GRUPO CONTROLE

Resultados gerais, de AGEs-sAF e nutricionais

Cinquenta e nove indivíduos com idade média de 37 ± 12 anos, sendo 34 (57,6%) do gênero feminino, 47 (79,7%) da raça branca, com índice de massa corporal $26,2 \pm 5$ Kg/m², e TGF estimada pela equação CKD-EPI em 102 ± 14 mL/min realizaram medidas de AGEs-sAF com o aparelho AGE-Reader™.

Os níveis médios de AGEs-SAF foram de $2,33 \pm 0,4$ UA. Tabagismo foi encontrado em 5 (8,5%) dos componentes deste grupo. O escore de Framingham foi aplicado em 37 (62,7%) destes indivíduos resultando em 31 (83,8%) indivíduos classificados com baixo RCV, 4 (10,8%) com intermediário RCV e apenas 2 (5,4%) com elevado RCV.

Trinta e dois (54,2%) desses indivíduos realizaram análise do conteúdo nutricional dietético, com quantificação da ingestão de AGEs total (11.943 ± 5.581 KU/dia), e dos subtipos específicos de AGEs – metilglioxal (MG) (14.648 ± 10.902 nmol/dia) e CML (4.213 ± 3.941 KU/dia). A ingestão calórica total média foi de 2.118 ± 754 Kcal/dia.

Comparação entre médias de AGEs-sAF em populações de indivíduos híidos holandeses e grupo controle do presente estudo

O aparelho AGE-Reader™, utilizado no presente estudo para aferir o acúmulo de AGEs na pele, apresenta curva de médias de AGEs-sAF de acordo com a faixa etária definidas através de pesquisa realizada em população holandesa usada para estimativa de risco cardiovascular. A Tabela 2 demonstra as médias de AGEs-sAF por faixa etária do Grupo Controle do nosso estudo. Modelos de regressão linear foram ajustados para estimar a média do AGEs-sAF nas faixas etárias 0-10, 11-20, 71-80 e acima de 80 anos, não disponíveis em

nosso Grupo Controle, permitindo a construção estimada de uma curva e a comparação desta com a do estudo holandês (Figura 2). Os indivíduos de nosso Grupo Controle apresentaram valores médios de AGEs-sAF mais elevados que os holandeses, e o comportamento da curva parece ter o mesmo padrão. No entanto, a regressão linear das curvas mostra que elas são distintas entre si ($p = 0,048$). O presente recurso estatístico foi utilizado no intuito de se compreender se a estratificação de risco de DCV obtida no estudo holandês poderia ser aplicável à população de nosso estudo. Digno de nota, lembramos que o risco de DCV no Grupo DRC de nosso estudo também foi estimado pelo escore de Framingham.

Tabela 2. Valores de referência dos AGEs-sAF, de acordo com a idade, no grupo controle.

Faixa etária (anos)	AGEs-sAF (UA)	N
0 – 10	1,45*	0
10 – 20	1,74*	0
20 – 30	$2,13 \pm 0,25$	10
30 – 40	$2,21 \pm 0,31$	11
40 – 50	$2,60 \pm 0,34$	7
50 – 60	$2,88 \pm 0,42$	6
60 – 70	$3,03 \pm 0,32$	3
70 – 80	3,36*	0
80 +	3,63*	0

AGEs-sAF, intensidade média tecidual de produtos finais de glicação avançada medidos pela autofluorescência da pele; UA, unidades arbitrárias. *Valores de média de AGEs-sAF estimados através de regressão linear.

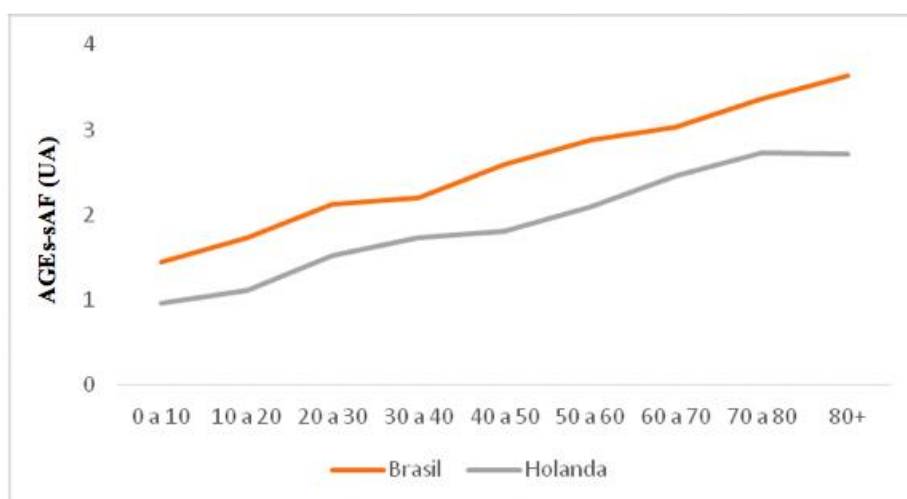


Figura 2. Comparação entre as curvas de valores médios de AGEs-sAF em indivíduos do Grupo Controle e indivíduos holandeses (73). AGEs-sAF, intensidade média tecidual de produtos finais da glicação avançada medidos pela autofluorescência da pele; UA, unidades arbitrárias

GRUPO DRC

Resultados clínico-demográficos, laboratoriais gerais e nutricionais

O grupo DRC apresentou-se com idade média de $53,7 \pm 11,8$ anos e era predominantemente do gênero masculino (17; 65,4%). Quatorze (53,8%) pacientes referiram-se como brancos. A principal comorbidade encontrada, além da DRC, foi a HAS em 85% dos casos. Nove indivíduos (34,6%) eram portadores de DM. A TFG média do grupo foi estimada pela equação CKD-EPI em 28 ± 11 mL/min e a microalbuminúria média dos doentes foi de $811,4 \pm 833$ mg/g. Doze (46,2%) pacientes foram classificados na categoria 3 de DRC, enquanto 14 (53,8%) compunham a DRC categoria 4. HAS foi a principal etiologia da DRC com 9 (34,6%) casos, seguida por nefrotoxicidade em 6 (23,1%) indivíduos. Tabagismo era o hábito de 5 (19,2%) dos pacientes. As características clínicas e demográficas estão apresentadas na Tabela 3, enquanto os achados bioquímicos se encontram na Tabela 4.

Em Comparação ao Grupo Controle, o Grupo DRC foi composto por pacientes mais velhos ($53,7 \pm 11,8$ vs. 37 ± 12 ; $p < 0,001$) e diferentes quanto a composição racial branca [10 (50%) vs. 33 (89%); $p = 0,001$]. O grupo DRC, como esperado, apresentou níveis maiores de pressão arterial sistólica (140 ± 28 vs. 113 ± 11 ; $p < 0,001$) e menor TFG (28 ± 11 vs. 102 ± 14 ; $p < 0,001$). Marcadores inflamatórios como a ferritina, VHS e PCR foram significativamente maiores no grupo DRC quando comparados ao Grupo Controle (Tabela 4).

A análise nutricional foi viável em 17 (65%) pacientes. As médias de consumo de AGEs total (10.558 ± 5.684 KU/dia), e de seus subtipos MG (10.488 ± 5.800 nmol/dia) e CML (3.790 ± 3.349 KU/dia) no Grupo DRC foram inferiores ao observado no Grupo Controle assim como a ingestão calórica total diária, embora sem significância estatística (Figura 3). Dados sobre o consumo nutricional geral, de AGEs e de seus subtipos específicos estão listados na Tabela 5.

Tabela 3. Dados clínicos e demográficos da população do grupo DRC e grupo controle.

Parâmetro	DRC	N	Controle	N	P
Idade (anos)	53,7 ± 11,8	26	37,2 ± 12,3	59	0,001
Gênero (feminino, %)	9 (34,6)	26	34 (57,6)	59	0,05
Raça (Branca, %)	14 (53,8)	26	47 (79,7)	59	0,01
Índice de massa corporal (kg/m ²)	28,5 ± 4,6	26	26,2 ± 5	37	0,67
Relação cintura-quadril	0,96 ± 0,09	19	0,85 ± 0,12	37	0,014
Pressão arterial sistólica	140 ± 28	26	113 ± 11	37	< 0,001
ITB	1,09 ± 0,14	25	1,09 ± 0,09	37	0,98
TFG CKD-EPI (mL/min)	28 ± 11	26	102 ± 14	37	< 0,001
Comorbidades (N, %)					
Tabagismo ativo ou prévio	5 (19,2)	26	5 (8,5)	59	NA
Hipertensão arterial sistêmica	23 (88,5)	26	0	59	NA
Acidente vascular encefálico	1 (3,8)	26	0	59	NA
Insuficiência Cardíaca	2 (7,7)	26	0	59	NA
Diabetes Mellitus	9 (34,6)	26	0	59	NA
Categoria da DRC (N, %)		26			
Categoria 3	12 (46,2)		-	-	NA
Categoria 4	14 (53,8)		-	-	NA
Etiologia da DRC (N, %)		26			
Hipertensão arterial sistêmica	9 (34,6)		-	-	NA
Nefrotoxicidade	6 (23,1)		-	-	NA
Glomerulonefrite crônica	2 (7,7)		-	-	NA
Diabetes <i>Mellitus</i>	2 (7,7)		-	-	NA
Pielonefrite Crônica	2 (7,7)		-	-	NA
Indeterminada	2 (7,7)		-	-	NA
Doença isquêmica renal	1 (3,8)		-	-	NA
Litíase renal	1 (3,8)		-	-	NA
Refluxo vesico ureteral	1 (3,8)		-	-	NA

DRC, doença renal crônica; NA, não se aplica; NR, não realizado; TFG, taxa de filtração glomerular; CKD-EPI, *Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration*.

Tabela 4. Achados bioquímicos da população com DRC e sujeitos do grupo controle.

Parâmetro	DRC (N = 26)	Controle (N = 59) *	P
Albumina (g/dL)	3,9 ± 0,37	4,3 ± 0,26	<0,001
Creatinina (mg/dL)	2,67 ± 1,07	0,8 ± 0,16	<0,001
Uréia (mg/dL)	89,5 ± 37,2	29,4 ± 9	<0,001
Glicemia (mg/dL)	107 ± 37	86,7 ± 9,8	0,02
Hemoglobina glicada (%)	6,2 ± 1	5,3 ± 0,4	<0,001
Colesterol total (mg/dL)	158 ± 32,7	184,8 ± 38	0,006
LDL colesterol (mg/dL)	94 ± 25,6	108,5 ± 30,7	0,14
HDL colesterol (mg/dL)	42,7 ± 8,88	51,2 ± 12,2	0,003
Triglicerídeos (mg/dL)	127 (97,5 a 153,7)	113 (80 a 149)	0,53
Hemoglobina (g/dL)	13,9 ± 2,32	14,6 ± 1,3	0,16
Ferritina (mg/dL)	275 (155 a 583)	142 (110 a 274)	0,03
Proteína C-reativa (mg/dL)	4,7 (1,3 a 9,4)	0,31 (0,07 a 0,85)	0,002
VHS (mm/h)	30 (10,5 a 48,2)	11 (8 a 18,7)	0,001
Cálcio total (mg/dL)	9,2 ± 0,53	9,3 ± 0,32	0,27
Fosfato (mg/dL)	3,6 ± 0,84	3,4 ± 0,53	0,39
Fosfatase alcalina (UI/L)	83 ± 25,1	60,5 ± 22,7	0,001
Vitamina D (ng/dL)	30,2 ± 12,7	19,1 ± 8,2	<0,001
PTHi (pg/mL)	115,5 (52,2 a 195)	-	NA
CML (ng/mL)	10,3 (8,7 a 25,4)	-	NA

LDL, lipoproteínas de baixa densidade; HDL, lipoproteínas de alta densidade; PTHi, hormônio da paratireoide intacto; CML, carboximetil-lisina; NA, não se aplica; VHS, Velocidade de hemossedimentação. * Dados disponíveis em apenas 37 sujeitos.

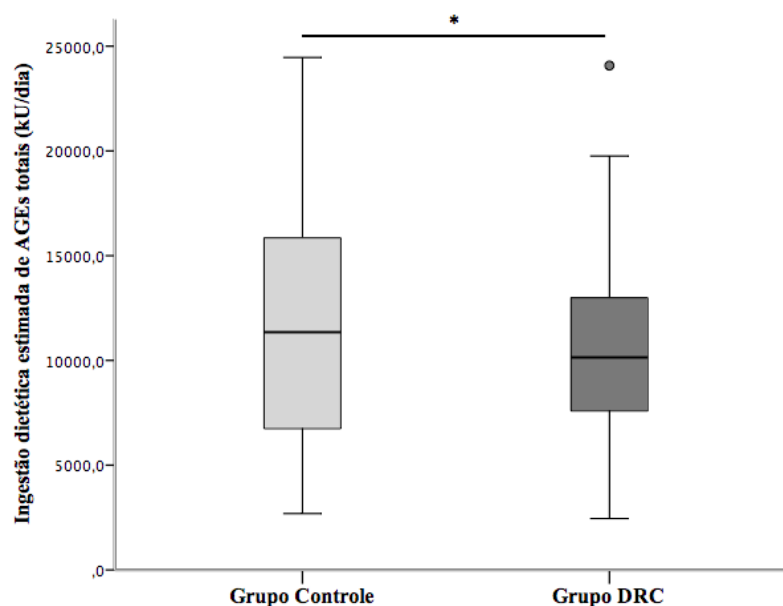


Figura 3. Comparação entre as médias do consumo dietético de AGEs total entre o Grupo Controle e Grupo DRC; DRC, Doença renal crônica; KU, quilo unidades; * p = N.S.

Tabela 5. Média de consumo de parâmetros dietéticos nos grupos DRC e controle.

Parâmetro	DRC (N = 17)	Controle (N = 32)	P
AGEs total (KU)	10.558 ± 5.684	11.943 ± 5.581	0,416
Metilglioxal (nmol)	10.488 ± 5.800	14.648 ± 10.902	0,15
Carboximetil-lisina (KU)	3.790 ± 3.349	4.213 ± 3.941	0,7
Energia (Kcal)	1.836 ± 351,5	2.118 ± 754	0,15
Calorias AGEs (Kcal)	1.611 ± 234	1.773,6 ± 688	0,35
Calorias não-AGEs (Kcal)	225 ± 224	344,7 ± 254	0,11
Proteína (g)	84,7 ± 22,8	92 ± 37	0,44
Lipídio (g)	61 ± 19,7	72 ± 25	0,13
Carboidrato (g)	249 ± 59,3	278 ± 122	0,35
Fibra (g)	25,4 ± 9,1	20 ± 14	0,18
Cálcio (mg)	516,1 ± 177	804 ± 404	0,008
Fosfato (mg)	1.097 ± 244	1.303 ± 565	0,16
Sódio (mg)	1.642 ± 776	2.130 ± 924	0,07
Potássio (mg)	2.574,5 ± 723,5	2.652 ± 934	0,8
Colesterol (mg)	199,0 ± 86	302 ± 159	0,01

DRC, doença renal crônica; KU, quilo unidades; Kcal, quilocalorias;

Intensidade de AGEs-sAF, níveis séricos de AGEs, deposição de AGEs na camada de osso cortical e suas inter-relações

Os níveis teciduais de AGEs-sAF foram quantificados em 24 (92,3%) pacientes resultando em um valor médio de $3,15 \pm 0,7$ UA. Apresentaram correlação positiva com a idade no grupo DRC ($R = 0,74$; $p < 0,001$). A Figura 4A mostra a comparação dos níveis médios de AGEs-sAF entre indivíduos hígidos (Grupo Controle) e o Grupo DRC ($2,33 \pm 0,4$ vs. $3,15 \pm 0,7$ UA; $p < 0,001$). Não houve uma associação significativa entre os AGEs da pele e a presença de DM quando comparados ao subgrupo sem DM, no Grupo DRC. No entanto, os dados demonstram uma correlação positiva entre AGEs-sAF e os valores de glicemia ($R = 0,40$; $p = 0,048$).

Quanto menor a TFG, maior foi o resultado da intensidade dos AGEs-sAF ($R = -0,48$; $p = 0,0016$). Quando analisados os subgrupos classificados nas categorias 3 e 4 de DRC notaram-se diferenças quanto aos níveis de AGEs-sAF. Índices mais elevados destes foram encontrados no subgrupo DRC categoria 4 em comparação ao subgrupo DRC categoria 3 ($2,7 \pm 0,49$ vs. $3,5 \pm 0,8$ UA; $p = 0,01$). Microalbuminúria não se correlacionou a intensidade de

AGEs-sAF ($R = 0,355$; $p = 0,96$). Não houve correlação entre os níveis de AGEs-sAF e ingestão dietética de AGEs total ($R = 0,017$; $p = 0,949$). Os níveis de CML séricos [10,3 (8,7 a 25,4 ng/mL)] não se correlacionaram com os níveis de AGEs-sAF ($R = 0,039$; $p = 0,88$) ou com a ingestão dietética de AGEs ($R = -0,06$; $p = 0,81$).

A porcentagem de AGEs no tecido cortical ósseo, quantificada em 14 (54%) dos pacientes do grupo DRC, se correlacionou positivamente com AGEs-sAF ($R = 0,64$; $p = 0,02$; Figura 4B) e negativamente com a TFG ($R = -0,54$; $p = 0,042$). A Figura 5 ilustra a relação de intensidade da imunomarcacão com anticorpo Anti-AGEs de traves ósseas conforme os níveis de AGEs-sAF de 3 diferentes pacientes.

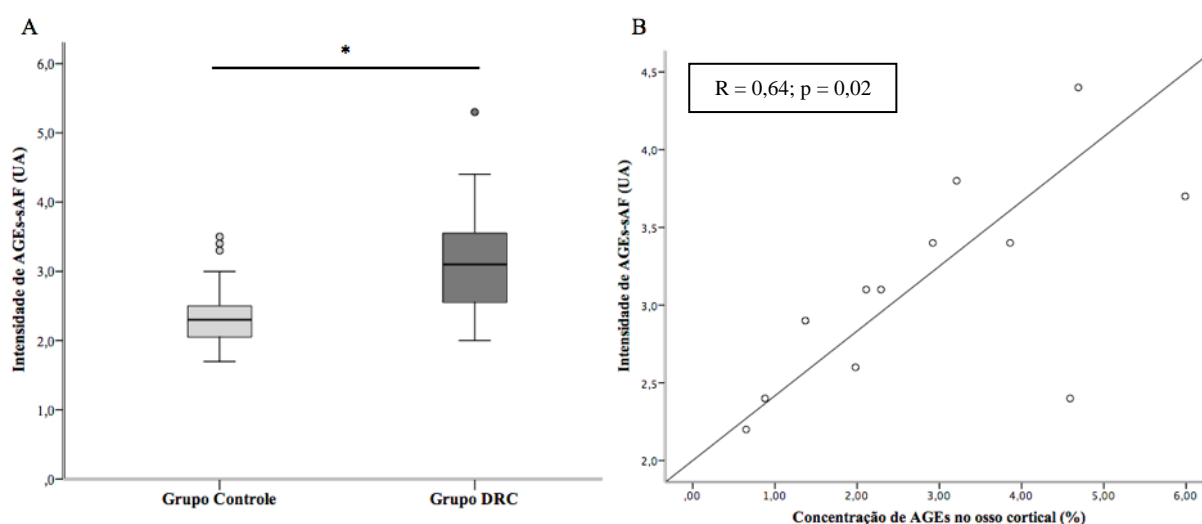


Figura 4. **A** - Comparação da intensidade de AGEs-sAF entre indivíduos hígidos (Grupo Controle) e pacientes (Grupo DRC). **B** - Quantificação média da porcentagem de AGEs no osso cortical pela técnica da imunoperoxidase e sua correlação positiva com AGEs-sAF nos pacientes do grupo DRC. AGEs-sAF, intensidade média tecidual de produtos finais de glicação avançada medidos pela autofluorescência da pele; DRC, Doença renal crônica; UA, unidade arbitrária; * $p < 0,001$.

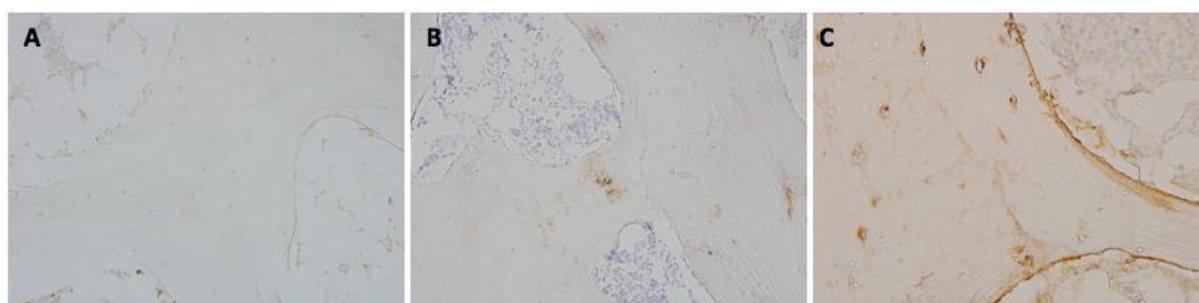


Figura 5. Imunomarcacão para AGEs (Abcam 23722) em tecido ósseo de pacientes com DRC. Micrografias representativas das traves ósseas em aumento de 400x. **A)** Paciente com AGEs-sAF 2,2 UA; **B)** Paciente com AGEs-sAF 3,1 UA e **C)** Paciente com AGEs-sAF 4,4 UA. AGEs-sAF, intensidade média tecidual de produtos finais de glicação avançada medidos pela autofluorescência da pele; DRC, Doença renal crônica; UA, unidade arbitrária.

AGES e suas relações com parâmetros de doença cardiovascular e consumo nutricional

Os parâmetros relativos à DCV analisados por meio de exames de imagem no grupo DRC encontram-se listados na Tabela 6. Dentre os resultados obtidos por ecocardiograma com Doppler, somente 4 (21%) indivíduos apresentavam hipertrofia do ventrículo esquerdo. Os demais parâmetros ecocardiográficos estavam, em média, dentro da normalidade. Da mesma forma, nenhum paciente apresentou valor de ITB acima da referência. Sua aferição não foi possível em um dos indivíduos do grupo DRC devido à detecção de artérias não compressíveis. Em 4 indivíduos (16%) encontramos valores de ITB $\leq 0,9$, no entanto, como o n foi reduzido não pudemos estimar nenhuma correlação estatística com os níveis de AGEs-sAF.

Os pacientes com DRC foram classificados quanto ao RCV a partir do escore de Framingham, encontrando 17 (65,4%) indivíduos com RCV baixo; 7 (26,9%) com RCV médio; e 2 (7,7%) com alto RCV. A pontuação obtida pelo escore de Framingham se correlacionou positivamente com o AGEs-sAF ($R = 0,5$; $p = 0,048$; Figura 6). O RCV a partir da medida da deposição tecidual de AGEs por meio do instrumento AGE Reader™ não foi valorizado visto que na regressão linear, a curva dos controles brasileiros deste estudo foi diferente da curva dos controles holandeses ($p = 0,048$) presente no *software* do AGE Reader™ (Figura 2).

CV foi encontrada em 6 (31,6%) dos pacientes DRC. Em uma análise deste subgrupo, os níveis de AGEs-sAF foram maiores naqueles com a presença de CV em relação ao subgrupo sem CV ($3,3 \pm 0,27$ vs. $2,8 \pm 0,44$; $p = 0,048$; Figura 7). Em relação à dieta, o subgrupo com CV presente obteve maior ingestão dietética da fração Metilglioxal de AGEs ($17.231,7 \pm 2638,5$ vs. $8589,2 \pm 5174$ nmol; $p = 0,014$; Figura 8A) e da fração CML de AGEs ($8.216,3 \pm 3192,3$ vs. $2.543,3 \pm 2441,6$ KU; $p = 0,05$; Figura 8B), comparados ao subgrupo de pacientes sem CV.

Houve correlação positiva entre os níveis de AGEs-sAF e o septo interventricular dos pacientes DRC ($R = 0,567$; $p = 0,018$; Figura 9). Do mesmo modo, a deposição tecidual de AGEs foi preditor independente da espessura do septo interventricular ($p = 0,03$). Finalmente, observamos correlação positiva entre AGEs-sAF e pressão arterial sistólica dos pacientes DRC ($R = 0,423$; $p = 0,039$) conforme ilustrado na Figura 10. Os níveis séricos de CML e a concentração de AGEs no osso cortical não se associaram a nenhum parâmetro cardiovascular analisado.

Tabela 6. Parâmetros de doença cardiovascular no grupo DRC.

Parâmetro	N	Resultados	Valores de referência
Massa de ventrículo esquerdo (g)	18	161,8 ± 50	94 a 276
Hipertrofia concêntrica de VE (N, %)	19	4 (21)	NA
Dimensão de átrio esquerdo (mm)	18	38 ± 4,26	20 a 40
Septo interventricular (mm)	18	9,0 ± 1,37	7 a 10
Fração de ejeção - Teicholz (%)	19	64,9 ± 4,2	> 58%
Calcificação vascular por Rx (N, %)	19	6 (31,6)	0
Índice tornozelo-braquial (ITB)	25	1,08 ± 0,12	0,91 a 1,39
ITB > 1,39 (N, %)		0 (0)	NA
ITB ≤ 0,9 (N, %)		4 (21)	NA
Escore de risco de Framingham (pontos)	26	5,3 ± 5,1	Variável

VE, ventrículo esquerdo; NA, não se aplica; Rx, radiografia de mãos, bacia ou lateral de abdome;

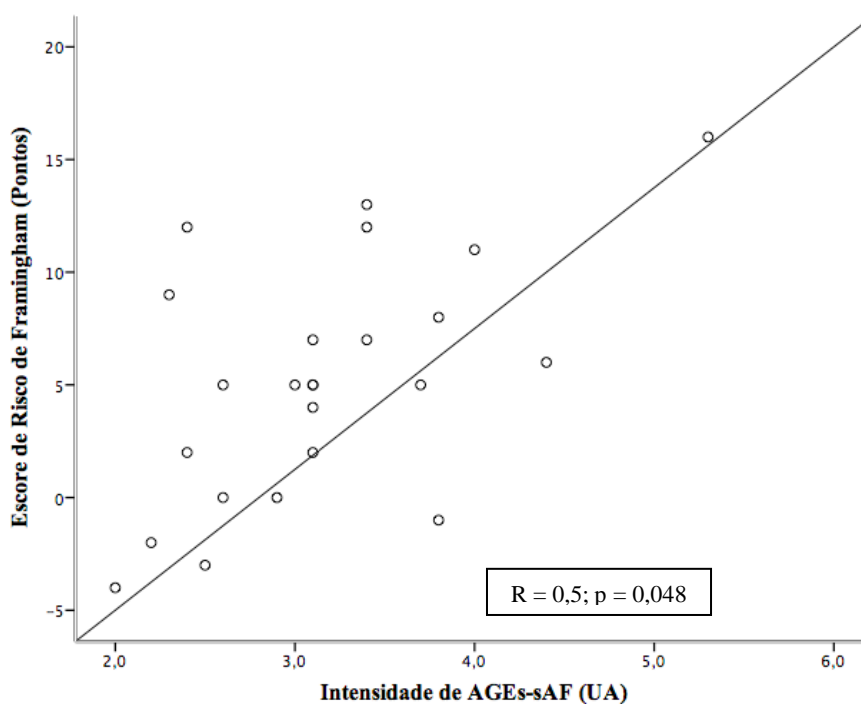


Figura 6. A Correlação positiva entre a pontuação do escore de risco de Framingham e o AGEs-sAF do grupo DRC ($R = 0,5$; $p = 0,048$). AGEs-sAF, intensidade média tecidual de produtos finais de glicação avançada medidos pela autofluorescência da pele; UA, unidade arbitrária.

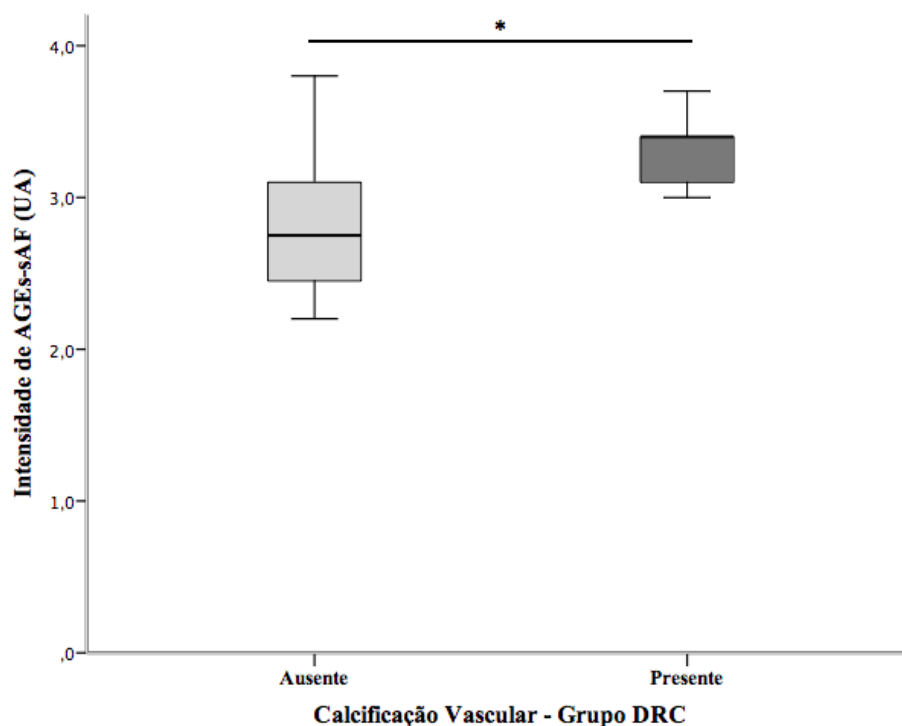


Figura 7. Comparação dos níveis de AGEs-sAF entre os pacientes com ($n = 6$) e sem calcificação vascular ($n = 13$) do grupo DRC. AGEs-sAF, intensidade média tecidual de produtos finais da glicação avançada medidos pela autofluorescência da pele; DRC, Doença renal crônica; UA, unidade arbitrária. * $p = 0,048$.

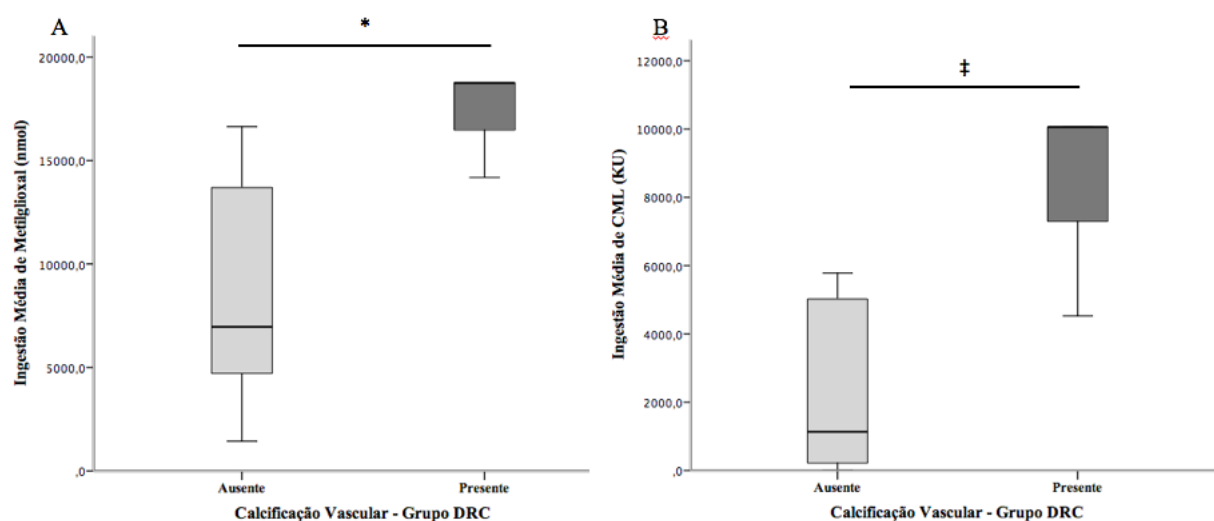


Figura 8. A – Comparação da ingestão dietética da fração metilgloxal de AGEs entre os subgrupos com ($n = 6$) e sem calcificação vascular ($n = 13$) do grupo DRC. **B** - Comparação da ingestão dietética da fração CML de AGEs entre os subgrupos com e sem calcificação vascular do grupo DRC. CML, carboximetil-lisina; DRC, Doença renal crônica; * $p = 0,014$; ‡ $p = 0,05$.

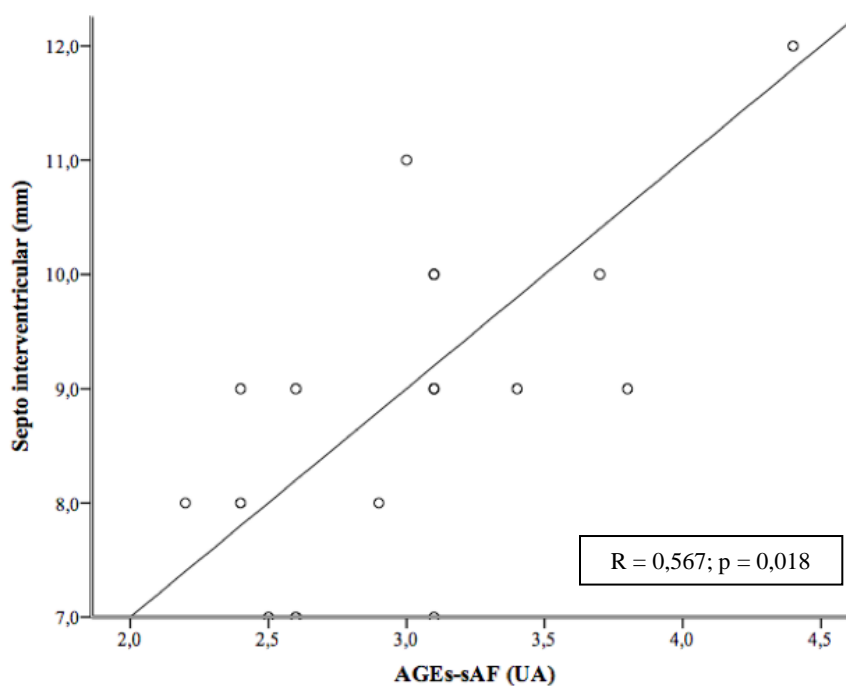


Figura 9. Correlação positiva entre AGEs-sAF e a espessura do septo interventricular dos pacientes DRC. AGEs-sAF, intensidade média tecidual de produtos finais de glicação avançada medidos pela autofluorescência da pele; UA, unidade arbitrária.

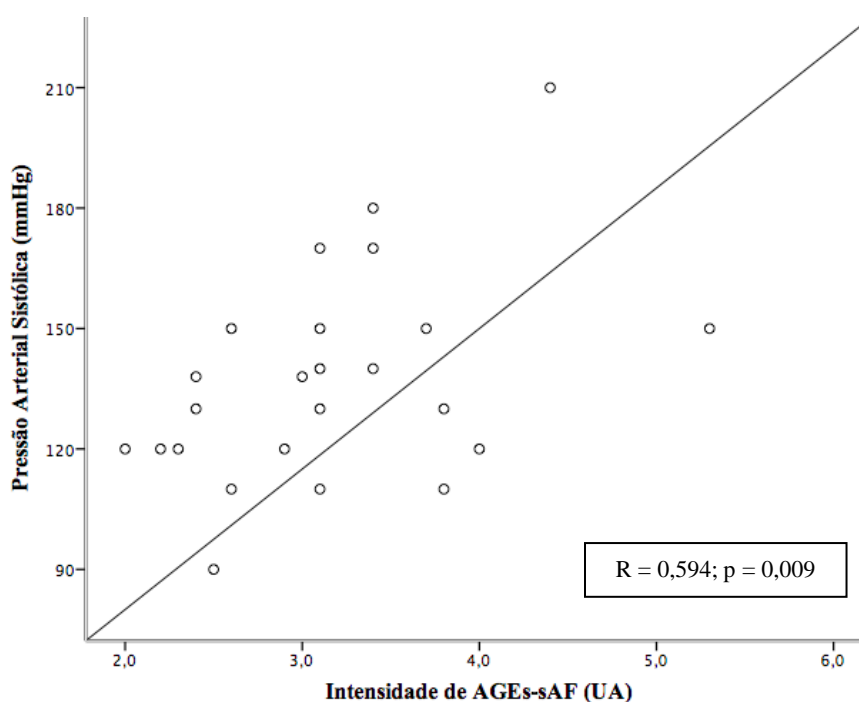


Figura 10. Correlação positiva entre AGEs-sAF e pressão arterial sistólica dos pacientes DRC. AGEs-sAF, intensidade média tecidual de produtos finais da glicação avançada medidos pela autofluorescência da pele; UA, unidade arbitrária

Resultados de parâmetros do tecido ósseo e suas relações com as medidas de AGEs-sAF, AGEs da cortical óssea e o consumo nutricional de AGEs

Os parâmetros de DMO foram avaliados através de densitometria óssea (N = 20), escore de Adragao, Kauppila e por dosagem sérica de indicadores do metabolismo ósseo (Tabela 7). Nenhum paciente avaliado apresentou índices de calcificação proeminente (Adragao > 3 e/ou Kauppila > 6 pontos) em nenhum dos escores. Osteopenia foi encontrada na densitometria óssea de 12 (60%) pacientes enquanto osteoporose se mostrou presente em 5 (25%) pacientes.

A biópsia óssea foi realizada em 20 pacientes. No entanto, somente 12 amostras foram analisadas em decorrência dos atrasos burocráticos na liberação e implementação dos equipamentos necessários para sua análise. Baseado em análise semi-quantitativa do tecido ósseo, 1 (8,3%) biópsia mostrou tecido ósseo normal, 9 (75%) com o diagnóstico de osteíte fibrosa (OF), e 2 (16,7%) com o diagnóstico de doença óssea adinâmica (DOA). Osteoporose foi diagnosticada em apenas 2 (16,7%) biópsias.

Dosagens dos níveis séricos de PTHi, fosfatase alcalina, cálcio, fosfato e vitamina D foram realizadas no intuito de avaliar a influência dos AGEs no metabolismo ósseo. AGEs-sAF se correlacionaram positivamente com PTHi (R = 0,42; P = 0,039; Figura 11A). Do mesmo modo, houve correlação positiva entre a intensidade da deposição de AGEs na camada cortical do tecido ósseo com os níveis séricos de PTHi (R = 0,56; P = 0,034; Figura 11B) e fosfato (R = 0,62; P = 0,018). Entretanto, não houve correlação destes exames com a ingestão dietética de AGEs mesmo após transformação logarítmica e comparação entre grupos acima e abaixo das medianas. Também não houve correlação entre AGEs-sAF, concentração de AGEs na cortical óssea ou consumo de AGEs com os dados da densitometria óssea ou com os escores de Adragao e Kauppila.

Tabela 7. Parâmetros ósseos avaliados por biópsia óssea, densitometria, bioquímica sérica e radiografia nos pacientes do Grupo DRC.

Parâmetro	N	Resultado	Valores de referência
Biópsia óssea analisada (N, %)	12 (60)		
Normal		1 (8,3)	NA
Osteíte Fibrosa		9 (75)	NA
DOA		2 (16,7)	NA
Densitometria óssea	20		
T-escore		-1,95 ± 0,6	0 - -1,5
Osteopenia (N, %)		12 (60)	NA
Osteoporose (N, %)		5 (25)	NA
Normal (N, %)		3 (15)	NA
Escore de Adragao	19	0,16 (0-2)	0
Escore de Kauppila	19	0,53 (0-4)	0
Cálcio total (mg/dL)	26	9,2 ± 0,53	8,8-10,6
Fosfato (mg/dL)	26	3,6 ± 0,84	2,5-4,5
PTHi (pg/mL)	26	115,5 (52,2 a 195)	15-65
Fosfatase alcalina (U/L)	24	83 ± 25,1	30-120
Vitamina D (ng/dL)	23	30,2 ± 12,7	31-100

DOA, doença óssea adinâmica; PTHi, hormônio da paratireoide; NA, não se aplica.

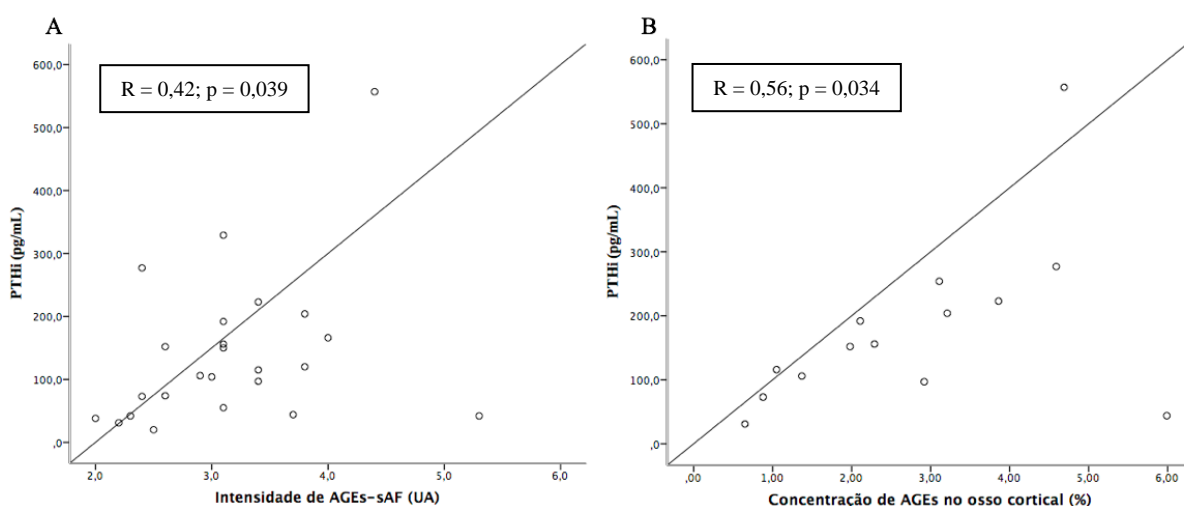


Figura 11. **A** – Correlação positiva entre AGEs-sAF e PTHi dos pacientes DRC. **B** - Correlação positiva entre a concentração de AGEs do osso cortical e PTHi do grupo DRC. PTHi, hormônio intacto da paratireoide; AGEs-sAF, intensidade média tecidual de produtos finais da glicação avançada medidos pela autofluorescência da pele; DRC, Doença renal crônica; UA, unidade arbitrária.

4. DISCUSSÃO

Os principais achados do nosso estudo foram: níveis de AGEs na pele elevados para idade nos grupos Controle e DRC, com valores mais elevados neste último; níveis de AGEs-sAF mais elevados na DRC categoria 4 frente a categoria 3; associação positiva entre os níveis de AGEs-sAF com o tamanho do septo interventricular e pressão arterial sistólica; níveis médios de AGEs-sAF elevados na presença de CV; correlação positiva com níveis de PTHi e escore de Framingham. Outro achado importante foi a correlação entre AGEs-sAF e o acúmulo de AGEs no osso cortical, além da correlação positiva deste último com PTHi e fosfato e negativa com a função renal.

Os valores de AGEs-sAF foram mais elevados na população DRC do que em indivíduos hígidos, corroborando os resultados de estudos anteriores que demonstraram maiores níveis de AGEs teciduais e séricos em pacientes portadores de DRC. Além disso, AGEs-sAF foi maior em pacientes com pior função renal. Dois principais mecanismos explicam o acúmulo de AGEs nesta população: maior formação associada ao estresse oxidativo mais elevado em ambiente urêmico e menor excreção renal (8). Ressaltamos que o presente achado ocorreu mesmo diante de consumo dietético de AGEs semelhantes entre os grupos, reforçando os mecanismos acima de acúmulo de AGEs em pacientes com DRC.

Neste estudo observamos níveis teciduais de AGEs elevados para idade tanto no Grupo Controle quanto nos pacientes DRC, usando como referência um estudo holandês com amostra composta por indivíduos caucasianos (73). Este achado poder ser atribuído aos diferentes fototipos de pele e hábitos alimentares da população controle, uma vez que os AGEs da dieta são uma das principais fontes desta toxina e que a pigmentação da pele pode influenciar na medida de AGEs-sAF devido aos diferentes índices de refletância (77,78). No entanto, a comparação dos níveis de AGEs entre os grupos do nosso estudo mostrou diferenças significativas.

Destaca-se também que classificação de RCV baseada nos níveis de AGEs da pele e idade contida no *software* do AGE-Reader™ foi descartada devido a diferença significativa entre as curvas de referência do aparelho (controle holandês) e da nossa população (grupo controle). Existem poucos dados sobre a medida de AGEs por sAF em não-caucasianos, não havendo nenhum estudo em população Sul-Americana. Dessa forma, estudos futuros incluindo brasileiros são necessários para determinar valores de referência aplicáveis a nossa população e, assim, viabilizar uma análise mais fidedigna de RCV deste método não-invasivo de AGEs-sAF.

AGEs-sAF, ainda assim, foram capazes de prever pior risco cardiovascular já que quanto maior a pontuação encontrada no escore de risco de Framingham maior era a intensidade dos AGEs na pele. Este fato confere uma correlação mais robusta frente a estimativa de RCV.

Este estudo apresentou baixa prevalência de eventos cardiovasculares, CV e alterações cardíacas estruturais avaliadas por ecocardiografia. Devido à importante correlação entre AGEs e aterosclerose, a inclusão de exames de imagem mais direcionados à pesquisa de placas ateroscleróticas como ultrassonografia Doppler de carótidas ou a detecção da calcificação da artéria coronária pela tomografia computadorizada (escore de cálcio) podem somar dados importantes à esta análise (15).

Os AGEs exercem influência sobre o metabolismo ósseo. Evidências até aqui sugerem participação dos AGEs na doença óssea de baixo *turnover*. Estudos experimentais demonstraram que os AGEs foram capazes de inibir significativamente a proliferação e induzir a apoptose dos osteoblastos, além de bloquear a secreção do PTH em altas concentrações de glicose (29). Em um estudo brasileiro recente que analisou AGEs-sAF de uma população de pacientes com DRC em hemodiálise sem DM, houve correlação negativa dos níveis de AGEs-sAF com os valores de PTHi (79).

O nosso estudo, ao contrário, demonstrou correlação positiva tanto com AGEs-sAF quanto do AGEs do osso cortical com os valores de PTHi, e somente do AGEs ósseo com o fosfato sérico. Estes achados precisam ser confirmados em estudos futuros com maior número de pacientes e amostras de biópsias ósseas.

Fato curioso também foi o diagnóstico de osteíte fibrosa em 75% das biópsias ósseas analisadas, uma incidência muito maior quando comparada aos 32% de prevalência de OF segundo KDIGO em 2009 para as categorias 3-5 em conservador (80). No entanto, essa divergência pode ser explicada pelo pequeno número de pacientes do estudo, pelo caráter protocolar da biópsia realizada em indivíduos assintomáticos e ausência de pacientes DRC categoria 5 presentes na prevalência da citação.

Apesar do grupo DRC ter apresentado níveis maiores de AGEs na pele não houve a esperada correlação com a maior ingesta alimentar destes elementos neste grupo. Muito provavelmente, por se tratar de pacientes com seguimento ambulatorial conservador e metas nutricionais restritas.

No melhor do nosso conhecimento, o presente estudo clínico é o primeiro Sul-Americano a analisar a associação dos AGEs com DCV e DMO-DRC numa população DRC categorias 3 e 4. Esta é uma análise preliminar dos resultados e, portanto, a inclusão do restante das biópsias ósseas, achados da tomografia com escore de cálcio podem acrescentar dados

relevantes. Fator limitante do estudo foi o reduzido número de pacientes, assim como a ausência de negros, baixa idade média e a pequena prevalência de pacientes diabéticos.

5. CONCLUSÕES

Pela primeira vez, um estudo demonstrou uma correlação positiva de AGEs da pele e ósseo entre si e com os níveis de PTHi em uma população de pacientes com DRC categorias 3 e 4. Além disso, os presentes achados confirmaram níveis elevados de AGEs-sAF em pacientes com DRC categorias 3 e 4 em relação ao grupo controle de uma população de pacientes brasileiros. Do mesmo modo, constatamos níveis maiores de AGEs-sAF para menor função renal, e observamos correlações de AGEs-sAF com parâmetros reconhecidos de DCV, como septo interventricular, pressão arterial sistólica, presença de CV e escore de Framingham. Estudos adicionais são necessários para elucidar a natureza da associação entre AGEs, DCV e DMO-DRC, visando sugerir um novo alvo terapêutico para redução de morbimortalidade desta população. Ademais a realização de estudo de validação da técnica nesta população é essencial para estabelecer os valores de normalidade de AGEs-sAF para a população brasileira.

6. REFERÊNCIAS

1. Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) CKD Work Group. KDIGO 2012 Clinical Practice Guideline for the Evaluation and Management of Chronic Kidney Disease. *Kidney Int Suppl.* 2013; 3: 1-150.
2. Murphy D, McCulloch CE, Lin F, Banerjee T, Bragg-Gresham JL, Eberhardt MS, et al. Centers for Disease Control and Prevention Chronic Kidney Disease Surveillance Team. Trends in Prevalence of Chronic Kidney Disease in the United States. *Ann Intern Med.* 2016 Oct 4;165(7):473-81.
3. Sarnak MJ, Levey AS, Schoolwerth AC, Coresh J, Culleton B, Hamm LL, et al. American Heart Association Councils on Kidney in Cardiovascular Disease, High Blood Pressure Research, Clinical Cardiology, and Epidemiology and Prevention. Kidney disease as a risk factor for development of cardiovascular disease: a statement from the American Heart Association Councils on Kidney in Cardiovascular Disease, High Blood Pressure Research, Clinical Cardiology, and Epidemiology and Prevention. *Circulation.* 2003 Oct 28;108(17):2154-69
4. Shlipak MG, Fried LF, Cushman M, Manolio TA, Peterson D, Stehman-Breen C, et al. Cardiovascular mortality risk in chronic kidney disease: comparison of traditional and novel risk factors. *JAMA.* 2005 Apr 13;293(14):1737-45.
5. Muntner P, He J, Astor BC, Folsom AR, Coresh J. Traditional and nontraditional risk factors predict coronary heart disease in chronic kidney disease: results from the atherosclerosis risk in communities study. *J Am Soc Nephrol.* 2005 Feb;16(2):529-38.
6. Foley RN, Wang C, Collins AJ. Cardiovascular risk factor profiles and kidney function stage in the US general population: the NHANES III study. *Mayo Clin Proc.* 2005 Oct;80(10):1270-7.
7. Kaysen GA, Eiserich JP. The role of oxidative stress-altered lipoprotein structure and function and microinflammation on cardiovascular risk in patients with minor renal dysfunction. *J Am Soc Nephrol.* 2004 Mar;15(3):538-48.
8. Arsov S, Graaff R, Van Oeveren W, Stegmayr B, Sikole A, Rakhorst G, et al. Advanced glycation end-products and skin autofluorescence in end-stage renal disease: A review. *Clin Chem Lab Med.* 2014;52(1):11–20.

9. Meerwaldt R, Links T, Zeebregts C, Tio R, Hillebrands JL, Smit A. The clinical relevance of assessing advanced glycation end products accumulation in diabetes. *Cardiovasc Diabetol*. 2008;7:29.
10. Castro E. O Papel dos Produtos Finais de Glicosilação Avançada na Nefropatia Diabética. The role of advanced glycosylation end products in diabetic nephropathy. [cited 2017 Mar 22]; Available from: <http://www.scielo.mec.pt/pdf/am/v25n1/v25n1a03.pdf>
11. Barbosa JHP, Souza IT, Santana AEG, Goulart MOF. Determination of advanced glycation (ages) and lipoxidation (ales) end products in foods and biological systems: advances, challenges and perspectives. *Quim Nova* [Internet]. 2016;39(5):608–20. Available from: <http://www.gnresearch.org/doi/10.5935/0100-4042.20160048>
12. Thornalley PJ. The enzymatic defence against glycation in health, disease and therapeutics: a symposium to examine the concept. 2003 [cited 2017 Jul 12]; Available from: <http://www.biochemsoctrans.org/content/31/6/1341.full-text.pdf>
13. Bierhaus A, Hofmann MA, Ziegler R, Nawroth PP. AGEs and their interaction with AGE- receptors in vascular disease and diabetes mellitus. I. The AGE concept. *Cardiovasc Res*. 1998;37(3):586–600.
14. Goldin A, Beckman JA, Schmidt AM, Creager MA. Advanced glycation end products: Sparking the development of diabetic vascular injury. *Circulation*. 2006;114(6):597–605.
15. Janda K, Krzanowski M, Gajda M, Dumnicka P, Jasek E, Fedak D, et al. Vascular effects of advanced glycation end-products: Content of immunohistochemically detected AGEs in radial artery samples as a predictor for arterial calcification and cardiovascular risk in asymptomatic patients with chronic kidney disease. *Dis Markers*. Hindawi Publishing Corporation; 2015.
16. Sánchez E, Betriu À, Arroyo D, López C, Hernández M, Rius F, et al. Skin Autofluorescence and Subclinical Atherosclerosis in Mild to Moderate Chronic Kidney Disease: A Case- Control Study. *PLoS One*. 2017;12(1)
17. Den Dekker MAM, Zwiers M, Van Den Heuvel ER, De Vos LC, Smit AJ, Zeebregts CJ, et al. Skin autofluorescence, a non-invasive marker for AGE accumulation, is associated with the degree of atherosclerosis. *PLoS One*. 2013;8(12).
18. Park L, Raman KG, Lee KJ, Lu Y, Ferran LJ, Chow WS, et al. Suppression of accelerated diabetic atherosclerosis by the soluble receptor for advanced glycation end

- products. *Nat Med*; 1998 Sep;4(9):1025–31.
19. Kume S, Takeya M, Mori T, Araki N, Suzuki H, Horiuchi S, et al. Immunohistochemical and Ultrastructural Detection of Advanced Glycation End Products in Atherosclerotic Lesions of Human Aorta with a Novel Specific Monoclonal Antibody. *American J of Pathology*. 1995;147(3):654-67
 20. Lapolla A, Piarulli F, Sartore G, Ceriello A, Ragazzi E, Reitano R, et al. Advanced Glycation End Products and Antioxidant Status in Type 2 Diabetic Patients With and Without Peripheral Artery Disease. *Diabetes Care*. 2007;30(3):670–6.
 21. De Vos LC, Lefrandt JD, Dullaart RPF, Zeebregts CJ, Smit AJ. Advanced glycation end products: An emerging biomarker for adverse outcome in patients with peripheral artery disease. *Atherosclerosis*. 2016 Nov;254:291-9.
 22. Takahashi R, Imamura A, Yoshikane M, Suzuki M, Murakami R, Cheng XW, et al. High serum concentrations of pentosidine, an advanced glycation end product, are associated with low normal value of ankle-brachial index in apparently healthy men. *Metabolism*. 2011;60(5):649-54.
 23. Ren X, Shao H, Wei Q, Sun Z, Liu N. Advanced Glycation End-products Enhance Calcification in Vascular Smooth Muscle Cells. *J Int Med Res* 2009;37(3):847-54.
 24. Tanikawa T, Okada Y, Tanikawa R, Tanaka Y. Advanced Glycation End Products Induce Calcification of Vascular Smooth Muscle Cells through RAGE/p38 MAPK. *J Vasc Res*. 2009;46(6):572-80.
 25. Hartog JWL, Voors AA, Bakker SJL, Smit AJ, van Veldhuisen DJ. Advanced glycation end- products (AGEs) and heart failure: Pathophysiology and clinical implications. *Eur J Heart Fail*. 2007;9(12):1146–55.
 26. Russo I, Frangogiannis NG. Diabetes-associated cardiac fibrosis: Cellular effectors, molecular mechanisms and therapeutic opportunities. *J Mol Cell Cardiol* 2016;90:84-93.
 27. Petrova R, Yamamoto Y, Muraki K, Yonekura H, Sakurai S, Watanabe T, et al. Advanced glycation end product-induced calcium handling impairment in mouse cardiac myocytes. *J Mol Cell Cardiol*. 2002;34(10):1425–31.
 28. Hein GE. Glycation end-products in osteoporosis - is there a pathophysiologic importance? *Clin. Chim. Acta* 2006; 371 :32-36.
 29. Yamamoto M, Sugimoto T. Advanced Glycation End Products, Diabetes, and Bone Strength. *Curr Osteoporos Rep*. 2016 Dec;14(6):320-26.

30. Eyre DR, Paz MA, Gallop PM. Cross-linking in collagen and elastin. *Annu Rev Biochem.* 1984;53:717–48.
31. Uzawa K, Grzesik WJ, Nishiura T, Kuznetsov SA, Robey PG, Brenner DA, et al. Differential expression of human lysyl hydroxylase genes, lysine hydroxylation, and cross-linking of type I collagen during osteoblastic differentiation in vitro. *J Bone Miner Res.* 1999;14(8):1272–80.
32. Bailey AJ, Paul RG, Knott L. Mechanisms of maturation and ageing of collagen. *Mech Ageing Dev.* 1998;106(1-2):1–56.
33. Depalle B, Qin Z, Shefelbine SJ, Buehler MJ. Influence of crosslink structure, density and mechanical properties in the mesoscale deformation mechanisms of collagen fibrils. *J Mech Behav Biomed Mater.* 2015;52:1–13
34. Monnier VM, Sell DR, Nagaraj RH, Miyata S, Grandhee S, Odetti P, et al. Maillard reaction-mediated molecular damage to extracellular matrix and other tissue proteins in diabetes, aging, and uremia. *Diabetes.* 1992;41 Suppl 2:36–41.
35. Karim L, Vashishth D. Heterogeneous glycation of cancellous bone and its association with bone quality and fragility. *PLoS One.* 2012;7(4):e35047.
36. Wang X, Shen X, Li X, Agrawal CM. Age-related changes in the collagen network and toughness of bone. *Bone.* 2002;31(1):1–7.
37. Nyman JS, Roy A, Tyler JH, Acuna RL, Gayle HJ, Wang X. Age-related factors affecting the postyield energy dissipation of human cortical bone. *J Orthop Res.* 2007;25(5):646–55.
38. Hernandez CJ, Tang SY, Baumbach BM, Hwu PB, Sakkee AN, van der Ham F, et al. Trabecular microfracture and the influence of pyridinium and non-enzymatic glycation-mediated collagen cross-links. *Bone.* 2005;37(6):825–32.
39. Farlay D, Armas LA, Gineyts E, Akhter MP, Recker RR, Boivin G. Nonenzymatic glycation and degree of mineralization are higher in bone from fractured patients with type 1 diabetes mellitus. *J Bone Miner Res.* 2016;31(1):190–5
40. Furst JR, Bandeira LC, Fan WW, Agarwal S, Nishiyama KK, McMahon DJ, et al. Advanced glycation end products and bone material strength in type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab.* 2016;101(6):2502–10.
41. Saito M, Fujii K, Soshi S, Tanaka T. Reductions in degree of mineralization and enzymatic collagen cross-links and increases in glycation-induced pentosidine in the femoral neck cortex in cases of femoral neck fracture. *Osteoporos Int.* 2006;17(7):986–

- 95.
42. Saito M, Fujii K, Marumo K. Degree of mineralization-related collagen crosslinking in the femoral neck cancellous bone in cases of hip fracture and controls. *Calcif Tissue Int*. 2006;79(3):160–8.
43. Barzilay JI, Buzkova P, Ziemann SJ, Kizer JR, Djousse L, Ix JH, et al. Circulating levels of carboxy-methyl-lysine (CML) are associated with hip fracture risk: the Cardiovascular Health Study. *J Bone Miner Res*. 2014;29(5):1061–6.
44. Yang DH, Chiang TI, Chang IC, Lin FH, Wei CC, Cheng YW. Increased levels of circulating advanced glycation end-products in menopausal women with osteoporosis. *Int J Med Sci*. 2014 Mar 13;11(5):453-60.
45. Hein G, Weiss C, Lehmann G, Niwa T, Stein G, Franke S. Advanced glycation end product modification of bone proteins and bone remodelling: hypothesis and preliminary immunohistochemical findings. *Ann Rheum Dis*. 2006 Jan;65(1):101-4.
46. Thornalley PJ. Cell activation by glycated proteins. AGE receptors, receptor recognition factors and functional classification of AGEs. *Cell Mol Biol(Noisy-le-grand)*. 1998 Nov;44(7):1013-23.
47. Notsu M, Yamaguchi T, Okazaki K, Tanaka K, Ogawa N, Kanazawa I, Sugimoto T. Advanced glycation end product 3 (AGE3) suppresses the mineralization of mouse stromal ST2 cells and human mesenchymal stem cells by increasing TGF- β expression and secretion. *Endocrinology*. 2014 Jul;155(7):2402-10.
48. Banse X, Devogelaer JP, Lafosse A, Sims TJ, Grynpas M, Bailey AJ. Cross-link profile of bone collagen correlates with structural organization of trabeculae. *Bone*. 2002;31(1):70-6.
49. Hernandez CJ, Tang SY, Baumbach BM, Hwu PB, Sakkee AN, van der Ham F, et al. Trabecular microfracture and the influence of pyridinium and non-enzymatic glycation-mediated collagen cross-links. *Bone*. 2005;37(6):825-32.
50. Wang X, Shen X, Li X, Agrawal CM. Age-related changes in the collagen network and toughness of bone. *Bone*. 2002;31(1):1-7. Erratum in: *Bone*. 2003;32(1):107.
51. Lin C-L, Huang C-C, Yu C-C, Yang H-Y, Chuang F-R, Yang C-W. Reduction of advanced glycation end product levels by on-line hemodiafiltration in long-term hemodialysis patients. *Am J Kidney Dis*. 2003 Sep;42(3):524-31.
52. Stein G, Franke S, Mahiout A, Schneider S, Sperschneider H, Borst S, et al. Influence of dialysis modalities on serum AGE levels in end-stage renal disease patients. *Nephrol*

- Dial Transplant. 2001;16(5):999–1008.
53. Klemm A, Franke C, Busch M, Muller A, Franke S, Lang D, et al. Influence of hemodialysis membrane permeability on serum levels of advanced glycation end products (AGEs) and homocysteine metabolites. *Clin Nephrol*. 2004;61(3):191–7.
 54. Floridi A, Antolini F, Galli F, Fagugli RM, Floridi E, Buoncristiani U. Daily hemodialysis improves indices of protein glycation. *Nephrol Dial Transplant*. 2002;17(5):871–8.
 55. Furuya R, Kumagai H, Tak Furuya R, Kumagai H, Takahashi M, Sano K, Hishida A. Ultrapure dialysate reduces plasma levels of beta2-microglobulin and pentosidine in hemodialysis patients. *Blood Purif*. 2005;23(4):311–6.
 56. Meerwaldt R, Graaff R, Oomen PHN, Links TP, Jager JJ, Alderson NL, et al. Simple non-invasive assessment of advanced glycation end product accumulation. *Diabetologia*. 2004 Jul;47(7):1324–30.
 57. Meerwaldt R, Hartog JW, Graaff R, Huisman RJ, Links TP, den Hollander NC, et al. Skin autofluorescence, a measure of cumulative metabolic stress and advanced glycation end products, predicts mortality in hemodialysis patients. *J Am Soc Nephrol*. 2005 Dec;16(12):3687–93.
 58. den Hollander NC, Mulder DJ, Graaff R, Thorpe SR, Baynes JW, Smit GP, et al. Advanced glycation end products and the absence of premature atherosclerosis in glycogen storage disease Ia. *J Inherit Metab Dis*. 2007 Nov;30(6):916–23.
 59. Meerwaldt R, Lutgers HL, Links TP, Graaff R, Baynes JW, Gans RO, et al. Skin autofluorescence is a strong predictor of cardiac mortality in diabetes. *Diabetes Care*. 2007 Jan;30(1):107–12.
 60. den Dekker MA, Zwiers M, van den Heuvel ER, de Vos LC, Smit AJ, Zeebregts CJ, et al. Skin autofluorescence, a non-invasive marker for AGE accumulation, is associated with the degree of atherosclerosis. *PLoS One*. 2013 Dec 23;8(12):e83084.
 61. Ueno H, Koyama H, Fukumoto S, Tanaka S, Shoji T, Shoji T, et al. Advanced glycation end products, carotid atherosclerosis, and circulating endothelial progenitor cells in patients with end-stage renal disease. *Metabolism*. 2011 Apr;60(4):453–9.
 62. Dzau VJ, Gneccchi M, Pachori AS, Morello F, Melo LG. Therapeutic potential of endothelial progenitor cells in cardiovascular diseases. *Hypertension*. 2005 Jul;46(1):7–18.
 63. Hartog JW, Hummel YM, Voors AA, Schalkwijk CG, Miyata T, Huisman RM, et al. Skin-autofluorescence, a measure of tissue advanced glycation end-products (AGEs), is

- related to diastolic function in dialysis patients. *J Card Fail*. 2008 Sep;14(7):596-602.
64. McIntyre NJ, Fluck RJ, McIntyre CW, Taal MW. Skin autofluorescence and the association with renal and cardiovascular risk factors in chronic kidney disease stage 3. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2011 Oct;6(10):2356-63.
 65. Lutgers HL, Graaff R, de Vries R, Smit AJ, Dullaart RP. Carotid artery intima media thickness associates with skin autofluorescence in non-diabetic subjects without clinically manifest cardiovascular disease. *Eur J Clin Invest*. 2010 Sep;40(9):812-7.
 66. Levey AS, Stevens LA, Schmid CH, Zhang YL, Castro AF 3rd, Feldman HI, et al. CKD-EPI (Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration). A new equation to estimate glomerular filtration rate. *Ann Intern Med*. 2009 May 5;150(9):604-12. Erratum in: *Ann Intern Med*. 2011 Sep 20;155(6):408
 67. Fitzpatrick TB. The validity and practicality of sun-reactive skin types I through VI. *Arch Dermatol*. 1988 Jun;124(6):869-71.
 68. Kannel WB, McGee D, Gordon T. A general cardiovascular risk profile: the Framingham Study. *Am J Cardiol*. 1976;38(1):46-51.
 69. Aboyans V, Criqui MH, Abraham P, Allison MA, Creager MA, Diehm C, et al. Measurement and interpretation of the Ankle-Brachial Index: A scientific statement from the American Heart Association. *Circulation*. 2012;126(24):2890-909.
 70. Adragao T, Pires A, Lucas C, Birne R, Magalhaes L, Gonçalves M, et al. A simple vascular calcification score predicts cardiovascular risk in haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant*. 2004;19(6):1480-8.
 71. Kauppila LI, Polak JF, Cupples LA, Hannan MT, Kiel DP, Wilson PWF. New indices to classify location, severity and progression of calcific lesions in the abdominal aorta: A 25- year follow-up study. *Atherosclerosis*. 1997;132(2):245-50.
 72. World Health Organization. Assessment of fracture risk and its application to screening for postmenopausal osteoporosis. *World Heal Organ Tech Rep Ser*. 1994;
 73. Koetsier M, Lutgers HL, de Jonge C, Links TP, Smit AJ, Graaff R. Reference values of skin autofluorescence. *Diabetes Technol Ther*. 2010;12(5):399-403
 74. Smit AJ, Smit JM, Botterblom GJ, Mulder DJ. Skin Autofluorescence Based Decision Tree in Detection of Impaired Glucose Tolerance and Diabetes. *PLoS One*. 2013;8(6):2-8.
 75. Uribarri J, Woodruff S, Goodman S, Cai W, Chen X, Pyzik R, et al. Advanced Glycation End Products in Foods and a Practical Guide to Their Reduction in the Diet. *J Am Diet*

- Assoc. 2010;110(6):911–6.
76. Moe S, Drüeke T, Cunningham J, Goodman W, Martin K, Olgaard K, et al. Definition, evaluation, and classification of renal osteodystrophy: A position statement from Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO). *Kidney Int.* 2006;69(11):1945–53.
 77. Meerwaldt R, Meerwaldt R, Links T, Graaff R, Thorpe SR, Baynes JW, Hartog J, Gans R, Smit A. Simple noninvasive measurement of skin autofluorescence. *Ann N Y Acad Sci.* 2005;1043:290-8.
 78. Uribarri J, Cai W, Sandu O, Peppia M, Goldberg T, Vlassara H. Diet-derived advanced glycation end products are major contributors to the body's AGE pool and induce inflammation in healthy subjects. In: *Annals of the New York Academy of Sciences.* 2005. p. 461–6.
 79. França RA, Esteves ABA, Borges CM, Quadros KRDS, Falcão LCN, Caramori JCT, et al. Advanced glycation end-products (AGEs) accumulation in skin: relations with chronic kidney disease-mineral and bone disorder. *J Bras Nefrol.* 2017;39(3):253-60.
 80. Improving Global Outcomes (KDIGO) CKD–MBD Work Group. KDIGO clinical practice guideline for the diagnosis, evaluation, prevention, and treatment of chronic kidney disease–mineral and bone disorder (CKD–MBD). *Kidney International* 2009; 76 (Suppl 113): S1–S130.

7. ANEXOS

7.1. Anexo I

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Avaliação dos produtos finais da glicosilação avançada (AGEs) medidos por autofluorescência da pele e sua associação com risco cardiovascular e distúrbio mineral ósseo em pacientes com doença renal crônica categorias 3 e 4.

Pesquisador: ANDRÉ DE BARROS ALBUQUERQUE ESTEVES

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 45777015.5.0000.5404

Instituição Proponente: Hospital de Clínicas da UNICAMP

Patrocinador Principal: FUNDACAO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE SAO PAULO

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.129.533

Data da Relatoria: 23/06/2015

Apresentação do Projeto:

Adequada. A doença cardiovascular (DCV) é a principal causa de morbimortalidade em pacientes com doença renal crônica (DRC). O risco de óbito por DCV nessa população é de dez a trinta vezes maior do que na população geral. A alta prevalência de DCV nos pacientes com DRC é devida, em parte, a alta incidência a fatores de risco tradicionais como diabetes melito (DM), dislipidemia, hipertensão arterial, idade avançada e sedentarismo. Estes fatores tem relação com o aparecimento e progressão da lesão aterosclerótica e calcificação vascular. Porém, a ocorrência desses fatores clássicos de risco não é suficiente para explicar completamente a forte associação entre DCV e DRC. Fatores relacionados à uremia podem contribuir para a piora das lesões cardiovasculares preexistentes ou induzir o aparecimento das mesmas. Na DRC, os produtos metabólicos que se acumulam no corpo são chamados de toxinas urêmicas. Têm efeito deletério sobre vários órgãos e tecidos, principalmente no sistema cardiovascular. Dentre as diversas toxinas urêmicas implicadas na patogênese da DCV, destacam-se os produtos finais da glicosilação avançada (AGEs, Advanced Glycation End products). Os AGEs compreendem vários produtos com atividade biológica resultantes da ligação não-enzimática entre carboidratos-proteínas (reação de Maillard), carboidratos-lipídeos podendo ser detectados no plasma ou em tecidos. AGEs podem ser gerados em indivíduos saudáveis de forma lenta, acumulando-se com a idade. Entretanto, em indivíduos com DM e uremia são gerados de forma acelerada. Podem também ser derivados de fonte exógena, como alimentos processados a altas temperaturas. Em um estudo que avaliou a absorção oral de AGEs, a administração de uma única refeição rica nesses produtos foi capaz de produzir elevação dos níveis plasmáticos e urinários, tanto em indivíduos saudáveis como em diabéticos, com ou sem DRC. A principal via de eliminação dos AGEs é através da filtração glomerular, observando-se o seu acúmulo conforme o decaimento da função renal. Outra causa de aumento

de formação dos AGEs em pacientes com DRC é o estresse oxidativo gerado pelo desequilíbrio entre forças pró-oxidantes e o sistema de defesa anti-oxidante. Os AGEs exercem vários efeitos potencialmente deletérios no corpo, que podem ser notados no sistema cardiovascular e tecido ósseo. No sistema cardiovascular o seu acúmulo contribui para alterações miocárdicas, disfunção endotelial, rigidez arterial e formação de placa aterosclerótica. Quando estas moléculas se ligam ao colágeno e a elastina eles se acumulam na matriz dos vasos sanguíneos de forma desordenada e disfuncional, mudando o tônus de modulação vasomotora endotelial, adesão plaquetária e proliferação celular. Suas ações no sistema vascular dão-se através da ligação com um receptor específico chamado RAGE. A Ativação do RAGE induz uma resposta inflamatória com liberação de citocinas levando aos efeitos descritos e a produção de moléculas de adesão, aumentando a proliferação da camada íntima dos vasos, angiogênese e estresse oxidativo. A geração de AGEs é um processo contínuo e inevitável in vivo sendo seu acúmulo e dano resultante mais evidente em tecidos de baixo turnover. Especula-se que os AGEs desempenham efeito negativo sobre o tecido ósseo e seu papel sobre a reabsorção e mineralização óssea são controversos. O conteúdo de AGEs aumenta durante o envelhecimento em todos os tecidos, incluindo os ossos. Contribui para mudanças estruturais e funcionais de proteínas ósseas levando a ligações cruzadas intramoleculares ou intermoleculares que explicam parcialmente os efeitos deletérios dos AGEs nas propriedades biomecânicas do osso. Níveis elevados de AGEs são encontrados no tecido ósseo de pacientes com osteoporose. Em um estudo clínico com mulheres na pós-menopausa, os níveis elevados de AGEs no plasma foram associados ao comprometimento da formação óssea e foi fator de risco para o desenvolvimento da osteoporose. Em pacientes com DM, os AGEs foram associados a fragilidade óssea por deterioração de sua qualidade. AGEs podem regular a proliferação e diferenciação dos osteoblastos. RAGE na presença de AGEs, é capaz de provocar em osteoblastos, a ativação do factor nuclear kappa-B resultando no aumento da expressão de citocinas, fatores de crescimento e moléculas de adesão. Em outros experimentos, AGEs suprimem a mineralização das células do estroma ST2 de ratos e inibem parcialmente a diferenciação dos osteoblastos por meio da ligação de RAGE e aumento da expressão e secreção de TGF β . Portanto, o acúmulo de AGEs no osso tem sido associado a uma redução de propriedades biomecânicas cortical e trabecular e com comprometimento funcional das células ósseas. Especula-se se intervenções dietéticas, medicamentosas ou dialíticas podem ter efeito sobre o seu nível sérico e impregnação nos tecidos, com impacto benéfico dessa modulação sobre o sistema cardiovascular e tecido ósseo. Qualquer intervenção terapêutica em relação aos AGEs necessita da quantificação do seu nível sérico ou tecidual ao longo do tempo. Recentemente, foi desenvolvida e validada uma técnica não invasiva para quantificar AGEs tecidual medindo a autofluorescência (AF) da pele (AGE-ReaderTM). O método foi validado com biópsias de pele de pacientes com DM, DRC e controles saudáveis. A AF da pele é elevada em função de AGEs em pacientes com DM e DRC, e está associada com maior mortalidade cardiovascular, independente de fatores de risco conhecidos para DCV. A medida de AGEs pela AF da pele também parece estar correlacionada com desfecho cardiovascular em pacientes em hemodiálise (HD). A quantificação dos AGEs nos tecidos pode ser preferível em relação ao plasma, uma vez que eles se acumulam nos tecidos e os níveis plasmáticos podem não refletir os níveis teciduais. Apesar dos níveis séricos de AGEs estarem aumentados nos pacientes com DRC, a AF se qualifica como foram inversamente associadas a células endoteliais progenitoras capazes de reparar o dano cardiovascular. Porém, em análise de regressão múltipla, somente a AF foi relacionada às células endoteliais progenitoras. Da mesma forma demonstrada por outros

autores onde somente a AF e não o AGE plasmático se mostrou fortemente associada a disfunção miocárdica diastólica. Os AGEs também se acumulam em pacientes urêmicos não-diabéticos, apesar de seus níveis normais de glicose no soro. Nas classes mais baixas de DRC, uma relação entre os níveis de AGEs, [Ne-carboximetil-lisina (CML)] e função renal também é evidente, tanto em grupos selecionados quanto na comunidade. Entre os pacientes em diálise, ambos os diabéticos e os não-diabéticos apresentam níveis elevados de pentosidina e CML no plasma. O aumentado estresse glicêmico da nefropatia diabética contribui para níveis elevados de AGEs tecidual e plasmático, enquanto que, na DRC o estresse oxidativo de baixo grau é comumente presente e contribui para formação de AGEs, independentemente da condição de DM. Autores mediram e compararam a AF da pele usando o AGE-Reader™ em 115 pacientes em diálise [62 em HD e 53 em diálise peritoneal (DP)]. Os valores da AF da pele foram semelhantes em pacientes em HD e DP, e fortemente correlacionados com a carga de exposição à glicose na DP. A AF da pele foi ainda correlacionada com a idade nos dois grupos e com o tempo em diálise apenas no grupo DP. Jiang e colaboradores avaliaram 2.388 pacientes em diálise (1775 em HD e 613 em DP) e evidenciaram o aumento da AF da pele, tanto em pacientes em DP convencional, quanto em pacientes em HD. Este aumento foi correlacionado com a duração da DP, exposição à glicose e DCV. A mesma autora em uma coorte de 1.707 pacientes DRC estágio III observou a associação entre vários fatores de risco cardiovascular e renal com a AF. Entre eles estão a taxa de filtração glomerular (TFG), hemoglobina, idade, tabagismo, colesterol total, pressão diastólica, proteína-C reativa (PCR), relação cintura quadril, albuminemia, velocidade de onda de pulso e DM. A AF da pele, em outros estudos, tende a ser associada a fatores de risco de mortalidade cardiovascular ou a evidência direta de dano cardiovascular como a correlação positiva com a espessura média-intimal da artéria carótida.[32] Finalmente, nenhum destes estudos avaliou simultaneamente AGEs e suas associações com distúrbios do metabolismo mineral e ósseo (DMO) e risco CV em pacientes DRC categorias 3 e 4. O presente estudo se propõe a investigar as possíveis associações entre AGEs avaliados indiretamente por AF da pele por meio do AGE-Reader™ e suas possíveis interações com parâmetros de DMO e marcadores de DCV em uma população de pacientes em tratamento conservador de DRC categorias 3 e 4.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Quantificar AGEs através de AF da pele em pacientes com DRC categorias 3 e 4 e estabelecer relações com características clínicas, parâmetros bioquímicos, marcadores de DCV e parâmetros do metabolismo mineral e ósseo.

Objetivo Secundário:

Comparar as medidas de AGEs por AF da pele com as medidas séricas de AGEs na população de pacientes brasileiros com DRC.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos: Agulhas intravenosas e exames de sangue: desconforto, possibilidade de infecção, além de hematoma ou edema temporário. Biópsia óssea: alguns riscos conhecidos, embora pouco frequentes, como hematoma, sangramento ou infecção local e potencial risco de dispepsia causada pelo antibiótico usado para a marcação do tecido ósseo, antes da biópsia óssea. **Benefícios:** A participação neste estudo poderá alterar o tratamento relativo ao controle dos distúrbios mineral e ósseo, a partir dos resultados da biópsia óssea. Com base nos resultados obtidos, esperamos conhecer mais sobre a ação dos produtos finais da glicosilação avançada

nos pacientes com DRC categorias 3 e 4 em tratamento conservador e gerar maior conhecimento científico sobre a doença renal.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O protocolo está bem escrito, detalhado e claro. A metodologia é adequada e factível. Estudo clínico observacional, transversal, a ser realizado em um grupo de 15 pacientes com diagnóstico DRC categoria 3 e outro grupo do mesmo tamanho com DRC categoria 4 em tratamento ambulatorial no Centro Integrado de Nefrologia (CIN) do Serviço de Nefrologia do Hospital de Clínicas da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), no período de Maio de 2015 a Maio de 2016 que serão comparados a um grupo controle. Serão analisados Dados demográficos: idade, gênero, raça, etiologia da DRC; Comorbidades: presença de DM, hipertensão arterial, insuficiência cardíaca congestiva, tabagismo, eventos cardiovasculares prévios, pelo menos um dos seguintes: infarto agudo do miocárdio, angina, acidente vascular encefálico, dissecação de aorta, aneurisma de aorta, doença arterial periférica. Avaliação cardiovascular: Escore de risco de Framingham, EcoDopplercardiograma, espessura médio intimal da carótida por ultrassonografia; Dados clínicos: peso, estatura, índice de massa corporal (IMC), índice tornozelo-braquial (ITB) e circunferência abdominal; Dados laboratoriais gerais como níveis séricos de ureia, creatinina, potássio, hemoglobina, hematócrito, ferro, ferritina, saturação de transferrina, glicemia de jejum, hemoglobina glicada, colesterol total e frações, triglicérides, ácido úrico, PCR, albumina, bicarbonato, β_2 -microglobulina, relação albumina-creatinina em amostra de urina, TFG estimada pela equação MDRD e CKD-Epi. Avaliação DMO por níveis séricos de cálcio, fosfato, hormônio da paratireoide (PTHrP), fosfatase alcalina (FA), 25-hidroxivitamina D (25VitD), alumínio, fosfatase alcalina óssea, esclerostina (TECOMedical, EUA), C-telopeptídeo de colágeno tipo-I [-CTX (Antibodies-Online, EUA)] e Deoxipiridinolina (Quidel Corporation, EUA), ambos marcadores de reabsorção óssea; Exames de imagem para avaliação de calcificação vascular: radiografias de mãos, e pelve (incidência pósterio-anterior), e abdome (incidência lateral); Tecido ósseo: por meio de biópsia óssea de crista ilíaca com análise histomorfométrica e densitometria óssea por DEXA (dual-energy X-ray absorptiometry); Titulação de AGEs: AGE-ReaderTM - AF da pele: uma medida da deposição de AGE da pele será avaliada no antebraço usando um dispositivo AGE ReaderTM (DiagnOptics, Groningen, Holanda). Três leituras serão tomadas e a média calculada. Áreas da pele tatuadas, fortemente sardentas ou com vasos perto a superfície de leitura serão evitadas. De acordo com o fabricante, o AGE Reader e seu software foram validados em pacientes com índice de reflexão de pele 6% (Fitzpatrick classe de I a IV). Apesar da medida da AF da pele não ser operator-dependente, todas as medidas serão realizadas pelo mesmo pesquisador. Os valores de AF da pele são expressos em unidades arbitrárias (UA). Dosagem dos níveis séricos de CML (Antibodies-Online, EUA) e pentosidina (Antibodies-Online, EUA). Avaliação do consumo de AGEs na dieta (KU/dia): um registro alimentar será preenchido pelo paciente pelo período de três dias e o conteúdo de AGEs da dieta será calculado de acordo com tabela de conteúdo de AGEs em 549 alimentos (disponível online a partir de [http://www.andjrn.org/article/S0002-8223\(10\)00238-5/abstract](http://www.andjrn.org/article/S0002-8223(10)00238-5/abstract)). O presente método foi validado por Uribarri e colaboradores.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Além do relatório de pesquisa, foi encaminhada a folha de rosto da CONEP assinada pela pesquisadora e complementada por autorização do Coordenador de Assistência do HC/UNICAMP. Com relação ao TCLE, a linguagem está clara. No TCLE constam o título completo da pesquisa e o nome do pesquisador responsável. Constam a justificativa, uma descrição dos procedimentos envolvidos, riscos e benefícios. Está explicado como será feito o

acompanhamento, e que poderá haver esclarecimentos se necessário. Está claro o direito de recusa e a confidencialidade dos dados. Está claro no TCLE que o sujeito irá receber uma cópia. Há dados do CEP e formas de contato com o pesquisador. Está claro que serão obtidas fotos dos pacientes, e como estas serão tratadas garantindo a confidencialidade.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Aprovado.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

- O sujeito de pesquisa deve receber uma via do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado.
- O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado.
- O pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado. Se o pesquisador considerar a descontinuação do estudo, esta deve ser justificada e somente ser realizada após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou. O pesquisador deve aguardar o parecer do CEP quanto à descontinuação, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade de uma estratégia diagnóstica ou terapêutica oferecida a um dos grupos da pesquisa, isto é, somente em caso de necessidade de ação imediata com intuito de proteger os participantes.
- O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo. É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.
- Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projetos do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma, junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial.
- Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, inicialmente seis meses após a data deste parecer de aprovação e ao término do estudo.
- Lembramos que segundo a Resolução 466/2012, item XI.2 letra e, “cabe ao pesquisador

apresentar dados solicitados pelo CEP ou pela CONEP a qualquer momento”.

CAMPINAS, 29 de Junho de 2015

Assinado por:
Renata Maria dos Santos Celeghini
(Coordenador)

7.2. Anexo II

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Título da pesquisa “Avaliação dos produtos finais da glicosilação avançada (AGEs) medidos por autofluorescência da pele e sua associação com risco cardiovascular e distúrbio mineral ósseo em pacientes com doença renal crônica categorias 3 e 4.”

Nome dos responsáveis: André de Barros Albuquerque Esteves, Cynthia de Moura Borges, Renata de Almeida França, Viviane Barcellos Menon, Kélcia Rosana da Silva Quadros e Rodrigo Bueno de Oliveira.

Número do CAAE: (45777015.5.0000.5404)

Você está sendo convidado a participar como voluntário de um estudo científico. Este documento, chamado Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), visa esclarecer a finalidade do estudo, dúvidas, e assegurar seus direitos e deveres como paciente participante da pesquisa, e é elaborado em duas vias, uma delas ficará com você e outra com o pesquisador.

Por favor, leia com atenção e calma, aproveitando para esclarecer suas dúvidas. Se houver perguntas antes ou mesmo depois de assiná-lo, você poderá esclarecê-las com o pesquisador. Se você não quiser participar ou retirar sua autorização, a qualquer momento, não haverá nenhum tipo de penalização ou prejuízo.

Justificativa e objetivos: Os produtos finais da glicosilação avançada (AGEs, em inglês) são componentes que estão associados a doenças, quando encontrados no corpo humano. Essas substâncias químicas inflamatórias estão relacionadas com a progressão da doença coronariana, dos danos causados pelo diabetes e pela doença renal. Os seres humanos estão expostos a duas principais fontes de AGEs. A fonte externa, que vem da dieta e a fonte interna, quando são formados no próprio organismo, principalmente em pacientes com doenças dos rins. Existe um aparelho capaz de medir, de forma rápida e indolor, a quantidade dessas substâncias na pele. O objetivo deste estudo é dosar a quantidade de AGEs através da pele em pacientes com doença renal crônica (DRC) categorias 3 e 4 em tratamento conservador e relacionar essa medida com dados clínicos, exames de sangue, marcadores de doença cardiovascular e de doença mineral óssea.

Procedimentos:

1. Será preenchida uma ficha com algumas informações suas, tais como idade, sexo, doenças associadas como hipertensão e diabetes melito, tabagismo e medicações em uso, além de um recordatório alimentar de três dias, que será preenchido por você, na sua casa. 2. Será utilizado um aparelho, chamado AGE-ReaderTM, para medidas das substâncias chamadas AGEs em sua pele. O método é rápido, não-invasivo e indolor.

3. Os exames de sangue e imagens que serão analisados são os rotineiramente pedidos para pacientes com DRC em tratamento conservador, além da guarda de 4 ml de plasma para posterior análises bioquímicas. Se você não tiver feito recentemente, serão solicitados radiografias de mãos, pelve e abdome, densitometria mineral óssea, ecocardiograma, ultrassom de carótida.

4. Será realizada uma biópsia óssea, da região do quadril (crista ilíaca), sob anestesia local, com dupla marcação por tetraciclina (antibiótico que se liga ao osso e serve para estimativa da taxa de formação de tecido ósseo ao longo do tempo).

Desconfortos e riscos: Critérios de exclusão: Você não deverá participar deste estudo se o aparelho (AGE-Reader™) não conseguir dosar a quantidade de AGEs no seu tipo de pele, se estiver com a pele amarelada (icterícia), se for portador(a) de diabetes, se estiver gestante, for portador(a) de doença terminal com expectativa de vida menor que 1 ano ou neoplasia avançada, se for portador(a) de doença inflamatória crônica grave, doença infecciosa grave ou ser portador(a) de transplante de órgão. **Agulhas intravenosas e exames de sangue:** alguns riscos conhecidos, embora raros, estão associados à colocação de uma agulha na veia. Entre esses riscos estão: desconforto, a possibilidade de infecção, além de hematoma ou inchaço temporário. **Biópsia óssea:** alguns riscos conhecidos, embora pouco frequentes, como hematoma, sangramento ou infecção local, e potencial risco de dispepsia causada pelo uso do antibiótico tetraciclina, utilizado para marcação da mineralização óssea, prescrito em duas ocasiões que precedem a realização da biópsia óssea: 10 dias antes da biópsia óssea (1 comprimido a cada 12 horas, por 2 dias), e 3 a 5 dias antes da biópsia óssea (1 comprimido a cada 12 horas, por 2 dias). Não será necessária internação hospitalar para a realização da biópsia, que será feita no centro de diálise. Você poderá ir embora após 2 horas de observação, devendo realizar repouso relativo por 24 horas após a biópsia óssea.

Benefícios: sua participação neste estudo poderá alterar o seu tratamento relativo ao controle dos distúrbios do cálcio, fosfato e hormônio da paratireoide (PTH), a partir dos resultados da biópsia óssea. Com base nos resultados obtidos, esperamos conhecer mais sobre a ação dos produtos finais da glicosilação avançada nos pacientes com DRC categorias 3 e 4 em tratamento conservador e gerar maior conhecimento científico sobre a doença renal.

Acompanhamento e assistência você será reavaliado pela equipe de pesquisadores logo após e uma semana depois da coleta do seu sangue e da biópsia óssea, para verificar a ocorrência dos desconfortos e riscos citados acima. Em caso de intercorrências relacionadas aos procedimentos do estudo, você poderá entrar em contato telefônico, com o Dr. André Esteves ou, a qualquer momento, com o Centro Integrado de Nefrologia (telefones listados no final deste termo) e receberá as orientações para o seu atendimento médico para que, caso necessário, uma conduta terapêutica adequada possa ser adotada.

Sigilo e privacidade: você tem a garantia de que sua identidade será mantida em sigilo e nenhuma informação será dada a outras pessoas que não façam parte da equipe de pesquisadores. Na divulgação dos resultados desse estudo, seu nome não será citado.

Ressarcimento: você não terá ressarcimento de despesas ao participar do estudo, mas a coleta de exames será realizada dentro da sua rotina de comparecimento ao hospital para o seu tratamento habitual, exceto uma visita extra para coleta de dados e leitura de AGEs na pele com o aparelho já citado (AGE-Reader™).

Armazenamento de material: O seu sangue e fragmento ósseo serão armazenados para repetição de exames já realizados, caso ocorram dúvidas ou para realização de novos exames que possam vir a contribuir para a conclusão da pesquisa, assim evitaremos a necessidade de novas coletas. Toda nova pesquisa a ser realizada com o material armazenado será submetida para aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) e, quando for o caso, da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP).

() concordo em participar do presente estudo, porém NÃO AUTORIZO o armazenamento do meu material biológico, devendo o mesmo ser descartado ao final desta pesquisa.

() concordo em participar do presente estudo e AUTORIZO o armazenamento do meu material biológico, sendo necessário meu consentimento a cada nova pesquisa, que deverá ser aprovada pelo CEP institucional e, se for o caso, pela CONEP.

() concordo em participar do presente estudo e AUTORIZO o armazenamento do meu material biológico, dispensando meu consentimento a cada nova pesquisa, que deverá ser aprovada pelo CEP institucional e, se for o caso, pela CONEP.

O descarte do material armazenado será autorizado nas seguintes situações: após 3 anos da coleta de sangue, ou imediatamente quando solicitado pelo paciente ou seu responsável legal. Em caso de falecimento ou condição incapacitante, os direitos sobre o material armazenado deverão ser dados a:

(indicar o nome de uma pessoa a ser contatada).

Contato: em caso de dúvidas sobre o estudo, você poderá entrar em contato com: Dr. André de Barros Albuquerque Esteves Centro Integrado de Nefrologia - Unicamp Rua Vital Brasil, 251, Cidade Universitária “Zeferino Vaz” Distrito de Barão Geraldo – Campinas, SP. Telefones: (19) 3521-7881 e (19) 98142-8477

Em caso de denúncias ou reclamações sobre sua participação no estudo, você pode entrar em contato com a secretaria do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP): Rua: Tessália Vieira de Camargo, 126; CEP 13083-887 Campinas – SP; telefone (19) 3521-8936; fax (19) 3521-7187; e-mail: cep@fcm.unicamp.br

Consentimento livre e esclarecido:

Após ter sido esclarecimento sobre a natureza da pesquisa, seus objetivos, métodos, benefícios previstos, potenciais riscos e o incômodo que esta possa acarretar, aceito participar: Nome e assinatura do(a) participante:

Data: ____/____/____.

Responsabilidade do Pesquisador:

Asseguro ter cumprido as exigências da resolução 466/2012 CNS/MS e complementares na elaboração do protocolo e na obtenção deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Asseguro, também, ter explicado e fornecido uma cópia deste documento ao participante. Informo que o estudo foi aprovado pelo CEP perante o qual o projeto foi apresentado e pela CONEP, quando pertinente. Comprometo-me a utilizar o material e os dados obtidos nesta pesquisa exclusivamente para as finalidades previstas neste documento ou conforme o consentimento dado pelo participante.

(Assinatura do pesquisador) Data: ____/____/____

7.3. Anexo III: Artigo publicado no Jornal Brasileiro de Nefrologia

Advanced glycation end-products (AGEs) accumulation in skin: relations with chronic kidney disease-mineral and bone disorder

Acúmulo dos produtos finais da glicação avançada (AGEs) na pele: relações com o distúrbio mineral e ósseo na doença renal crônica

Authors

Renata de Almeida França ¹
André de Barros Albuquerque Esteves ¹
Cynthia de Moura Borges ¹
Kélcia Rosana da Silva Quadros ¹
Luiz Carlos Nogueira Falcão ¹
Jacqueline Costa Teixeira Caramori ²
Rodrigo Bueno de Oliveira ¹

¹ Universidade Estadual de Campinas.

² Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho".

Submitted on: 12/15/2016.
Approved on: 3/3/2017.

Correspondence to:

Rodrigo Bueno de Oliveira.
Universidade Estadual de Campinas.
Rua Tessália Vieira de Camargo, nº 126, Campinas, Brazil.
CEP: 13083-887
E-mail: rodrigobueno.hc@gmail.com

DOI: 10.5935/0101-2800.20170042

ABSTRACT

Introduction: Chronic kidney disease (CKD) is associated with high morbidity and mortality rates, main causes related with cardiovascular disease (CVD) and bone mineral disorder (CKD-BMD). Uremic toxins, as advanced glycation end products (AGEs), are non-traditional cardiovascular risk factor and play a role on development of CKD-BMD in CKD. The measurement of skin autofluorescence (sAF) is a noninvasive method to assess the level of AGEs in tissue, validated in CKD patients. **Objective:** The aim of this study is analyze AGEs measured by sAF levels (AGEs-sAF) and its relations with CVD and BMD parameters in HD patients. **Methods:** Twenty prevalent HD patients (HD group) and healthy subjects (Control group, n = 24), performed biochemical tests and measurements of anthropometric parameters and AGEs-sAF. In addition, HD group performed measurement of intact parathormone (iPTH), transthoracic echocardiogram and radiographies of pelvis and hands for vascular calcification score. **Results:** AGEs-sAF levels are elevated both in HD and control subjects ranged according to the age, although higher at HD than control group. Single high-flux HD session does not affect AGEs-sAF levels. AGEs-sAF levels were not related to ventricular mass, interventricular septum or vascular calcification in HD group. AGEs-sAF levels were negatively associated with serum iPTH levels. **Conclusion:** Our study detected a negative correlation of AGEs-sAF with serum iPTH, suggesting a role of AGEs on the pathophysiology of bone disease in HD prevalent patients. The nature of this relation and the clinical application of this non-invasive methodology for evaluation AGEs deposition must be confirmed and clarified in future studies.

Keywords: hemodialysis units, hospital; parathyroid hormone; cardiovascular diseases; bone diseases; glycosylation end products, advanced.

RESUMO

Introdução: A doença renal crônica (DRC) apresenta elevadas taxas de morbidade e mortalidade, sendo a doença cardiovascular (DCV) e o distúrbio mineral e ósseo da DRC (DMO-DRC) complicações frequentes. As toxinas urêmicas, dentre elas os produtos finais da glicação avançada (AGEs), são fatores de risco cardiovascular não tradicionais e se encontram envolvidas no desenvolvimento do DMO-DRC na DRC. A medida da autofluorescência da pele (sAF) é método não invasivo para quantificação do acúmulo tecidual de AGEs validado em pacientes portadores de DRC. **Objetivos:** O objetivo deste estudo é avaliar as relações entre os AGEs medidos por sAF (AGEs-AF) e parâmetros de DCV e DMO-DRC em pacientes em hemodiálise (HD). **Métodos:** 20 pacientes em HD (grupo HD) e 24 indivíduos hígidos (grupo controle) foram submetidos à análise bioquímica sérica, medidas antropométricas e de sAF. O grupo HD realizou medida de hormônio intacto da paratireoide (PTHi), ecocardiograma transtorácico e radiografias de pelve e mãos para pesquisa de calcificação vascular. **Resultados:** Os níveis de AGEs-sAF foram elevados para a idade nos grupos HD e controle, porém mais elevados no grupo HD. Sessão única de HD de alto-fluxo não afetou os níveis de AGEs-sAF. Os níveis teciduais de AGEs não se correlacionaram com massa ventricular, espessura de septo interventricular ou calcificação vascular no grupo HD. Os níveis de AGEs-sAF se correlacionaram negativamente com os níveis séricos de PTHi. **Conclusão:** Nosso estudo detectou correlação negativa entre os níveis de AGEs-sAF e os níveis séricos de PTHi, sugerindo que os AGEs estejam envolvidos na fisiopatologia da doença óssea em pacientes em HD. A natureza desta relação e a aplicação clínica deste método não invasivo de avaliação do acúmulo tecidual de AGEs deve ser confirmada e elucidada por estudos futuros.

Palavras-chave: hemodiálise; hormônio intacto da paratireoide; doenças cardiovasculares; doenças ósseas; produtos finais de glicosilação avançada.

INTRODUCTION

Chronic kidney disease (CKD) is associated with high rates of morbidity and mortality. Patients under hemodialysis (HD) treatment have five-fold shorter life expectancy than healthy subjects do at the same age. The main causes of death in patients with end stage kidney disease (ESKD) are associated with cardiovascular disease (CVD) and bone mineral disorder (CKD-MBD).^{1,2}

In addition to traditional cardiovascular risk factors, uremic toxins are non-traditional factors associated with mortality in CKD patients. Advanced glycation end-products (AGEs) are uremic toxins which are elevated in CKD because of increased production by oxidative stress, impaired renal excretion and diet consumption.³ The measurement of skin autofluorescence (sAF) is a noninvasive method used to indirectly evaluate the accumulation of AGEs in this tissue. This methodology was validated in studies, including those with CKD patients, through the comparison between AGEs-sAF values and density of AGEs in skin biopsies processed by immunohistochemistry for AGEs.³⁻⁵

AGEs accumulation on tissue proteins seems to be a contributing factor in atherosclerosis. Some studies revealed elevated levels of AGEs in patients with coronary artery disease,⁶ carotid artery stenosis⁷ and peripheral artery disease,⁸ irrespective of diabetes *mellitus* (DM) or renal disease.⁹ For these reasons AGEs have been described as a predictor of cardiovascular mortality.^{3,10}

Another important potential clinical application of AGEs evaluation through sAF is to investigate its relations with CKD-MBD. Of note, AGEs seems to do negative effects on bone quality by mechanisms that are not fully elucidated, being associated with osteoporosis and osteopenia.¹¹ AGEs can reduce bone formation by interfering with the production of matrix proteins and inducing mesenchymal stem cells apoptosis.¹¹ Furthermore, AGEs may interfere with the osteoblast differentiation, proliferation and mineralization, actions that were demonstrated in cell culture studies.^{11,12}

AGEs seems to be involved in the pathogenesis of adynamic bone disease in CKD patients by inhibiting osteoblastic activity and parathormone secretion.¹³ Since AGEs could act on bone turnover by multiple mechanisms, they are probably related to serum intact

parathormone (iPTH), the most commonly used biomarker that supports CKD-MBD management,¹⁴ although this issue was not proven yet.

Considering that AGEs can affect both bone tissue and cardiovascular system, this study aim to evaluate the relations between AGEs accumulation in skin measured by sAF (AGEs-sAF) and CKD-MBD parameters through analysis of clinical, biochemical and image studies in a cohort of patients under chronic HD treatment.

MATERIALS AND METHODS

STUDY DESIGN AND SUBJECTS

This pilot study is an observational, transversal, controlled, single-center study involving CKD patients under HD treatment. Patients included in HD group (N = 20) were recruited from the Nephrology Department's outpatient HD clinic at Hospital das Clínicas, University of Campinas. All patients receiving chronic HD were dialyzed thrice weekly for four hours with high-flux and high-efficiency polysulphone dialyzers. The inclusion criteria for the study are as follows: age > 18 years old; undergoing HD for more than three months. Exclusion criteria were: skin phototypes "V" and "VI" by Fitzpatrick classification¹⁵ (skin colors that not allow the precise measurement of AGE-sAF by AGE-Reader™ following manufacturer's instructions), have clinical instability, cancer or HIV.

In order to compare the measurements of AGEs-sAF values we used a control group with apparently normal healthy subjects (n = 24) that fulfill following criteria: aged between 20 and 70 years; serum creatinine < 1.2 mg/dL; serum albumin > 3.5 mg/dL; do not have the diagnostic of DM, chronic inflammatory disease, not be pregnant or using medicines that exert influences on bone metabolism (i.e., anticonvulsants, bisphosphonates, calcimimetics, calcitonin, corticosteroids, GnRH analogs, vitamin D, dicumarinic, hormone replacement therapy, and thyroid treatments).

Written informed consent was obtained from all subjects, and the ethics committee of the University of Campinas approved the study protocol (CAAE 38406514.6.0000.5404). The study was performed in accordance with the precepts of the Declaration of Helsinki.

STUDY PROTOCOL

All patients were on their HD schedule in the second session of the week in order to perform laboratory blood tests and measurements of anthropometric parameters, blood pressure and AGEs-sAF.

Height and weight were measured without shoes, and without heavy clothing. Body mass index (BMI) was defined as weight (kg) divided by square of height (m²). Waist circumference (WC) was measured midway between the last rib and the crest of the ileum and hip circumference (HC) around the pelvis at the point of maximum protrusion of the buttocks, both in a horizontal plane, without compressing the soft tissues. WC and HC were recorded to the nearest cm and waist-to-hip ratio (WHR) was defined as a ratio of WC to HC. Systolic blood pressure was measured on the left arm in control group and on contralateral arm which do not have an arteriovenous fistula in HD patients.

In patients from HD group, transthoracic echocardiogram was performed to analyze left ventricular mass, valve calcification and interventricular septum thickness. Vascular calcification was evaluated in plain radiographic films of pelvis and hands by simple score proposed by Adragão *et al.*¹⁶ ranging from 0 to 8. The pelvis radiographic films were divided into four sections by two imaginary lines: a horizontal line over the upper limit of both femoral heads and a median vertical line over the vertebral column. The films of the hands were divided, for each hand, by a horizontal line over the upper limit of the metacarpal bones. The presence of linear calcifications in each section was counted as "1" and its absence as "0". Vascular calcifications were evaluated only in the follow arteries: iliacs, femorals, radials and digitals by the same observer.

An interview was conducted with all subjects focusing on comorbidities and disease history, both in general and specific previous cardiovascular disease (CVD). History of CVD was considered positive if the following events were present: myocardial infarction, stroke, heart failure, angina *pectoris* or surgical procedures for angina or coronary/peripheral artery disease (including percutaneous-transluminal angioplasty). The patient's medical files were reviewed in order to identify and record any concomitant medications. Patients and healthy subjects were classified according Framingham risk.¹⁷

LABORATORY TESTS

Blood samples were collected immediately before the second HD session of the week or in a previously scheduled date in control group. Serum creatinine, urea, potassium, hemoglobin, hematocrit, calcium, phosphate, alkaline phosphatase, iron, ferritin, transferrin saturation, fasting glycemia, glycated hemoglobin, total cholesterol, low density lipoprotein cholesterol (LDL), high density lipoprotein cholesterol (HDL), triglycerides, uric acid, C-reactive protein, 25-hydroxyvitamin D (chemiluminescence method), albumin, β 2-microglobulin and bicarbonate levels were assayed in an on-site biochemistry laboratory using standard auto-analyzer techniques (Modular IIPR system, Roche Diagnostics, Basel, Switzerland). Serum intact 1-84-parathormone (iPTH) was determined by a chemiluminometric immunoassay (Liaison N-tact PTH CLIAR, Diasorin, Stillwater).

MEASUREMENT OF AGEs-sAF

Tissue accumulation of AGEs was indirectly measured by evaluation of sAF with an instrument named AGE-Reader™ according to the supplier's recommendations (DiagOptics BV, Groningen, The Netherlands). This desktop device uses AGEs fluorescent properties to measure sAF, which is calculated as the ratio between the emission light and reflected excitation light, and is expressed in arbitrary units (AU).^{4,5} sAF was assessed on the ventral site of the lower arm. Pre- and post-HD evaluations of AGEs-sAF were performed in the second HD sessions of the week, on contralateral arm which do not have an arteriovenous fistula or left arm (control group).

All the measurements were performed in triplicate at room temperature in a room with windows covered by curtains to avoid sun illumination (semi-dark). The mean value of the triple measurement was used for further analysis. To rank AGEs tissue levels according to the age we used the reference values established in a Dutch cohort.¹⁸

STATISTICAL ANALYSIS

Data were expressed as the mean \pm SD, median and interquartile range or frequency, as appropriate. For descriptive and analytical purposes, data from patients in HD group were stratified according to the median AGEs-sAF levels (sAF AGEs < 2.7 AU *versus* \geq 2.7 AU). Intergroup comparisons were performed using a χ^2 test for categorical variables

and Student's t-test or a Mann-Whitney test for continuous variables. Pearson's correlation coefficient or Spearman's rank correlation was used to assess the relationships between AGEs-sAF and selected clinical or biochemical variables. The threshold for statistical significance was set to bicaudal $p < 0.05$. All statistical analyses were performed using SPSS software (version 17.0, SPSS Inc., Chicago).

RESULTS

Twenty-four healthy subjects (control group) and 20 patients (HD group) had completed the study. Clinical and demographic characteristics, as well biochemistry results are shown on Tables 1 and 2.

TABLE 1 CLINICAL AND DEMOGRAPHIC CHARACTERISTICS ACCORDING TO CONTROL AND HEMODIALYSIS GROUPS

Parameters	Control (n = 24)	HD (n = 20)	<i>p</i>
Age (years)	38 ± 9	38 ± 19	0.85
Female gender, n (%)	14 (58)	9 (43)	0.3
BMI (Kg/m ²)	25 ± 4	23.5 ± 6	0.3
Waist circumference (cm)	83.5 ± 14	87 ± 17	0.47
Waist-to-hip ratio	0.84 ± 0.1	0.92 ± 0.1 ^a	0.009
SBP (mmHg)	110 ± 9	132 ± 18 ^a	0.001

HD: Hemodialysis; BMI: Body mass index; SBP: Systolic blood pressure. ^a $p < 0.05$.

In control group, AGEs-sAF according to their age was higher in 22 (91%) subjects (2.3 ± 0.4 AU). AGEs-sAF were positively correlated with age ($R = 0.77$; $p = 0.001$), as well the serum C-reactive protein ($R = 0.48$; $p = 0.03$), triglycerides ($R = 0.43$; $p = 0.03$), total cholesterol ($R = 0.54$; $p = 0.006$) and glycated hemoglobin levels ($R = 0.46$; $p = 0.02$). Systolic blood pressure ($R = 0.46$; $p = 0.02$) and BMI ($R = 0.45$; $p = 0.02$) were clinical parameters positively associated with the parameter "age". The Framingham cardiovascular (CV) risk score were intermediate in 2 (8%) and low in 18 (91%) subjects.

In HD group, AGEs-sAF according to their age was high in all HD patients (2.6 ± 0.4 AU). Pre- and post-HD session AGEs-sAF measurements did not differ between them (2.6 ± 0.4 vs. 2.6 ± 0.4 ; $p = 0.18$), and were positively correlated ($R = 0.862$; $p = 0.0001$). Serum levels of iPTH were 397 ± 386 pg/mL, 25-hydroxyvitamin D 36.6 ± 11 ng/mL, bicarbonate 19 ± 3 mmol/L, alkaline phosphatase 94 ± 64 IU/mL and β_2 -microglobulin 4.6 ± 0.9 mg/mL. The Framingham cardiovascular (CV) risk score were high in 1 (5%), intermediate in 2 (10%) and low in 17 (85%) patients.

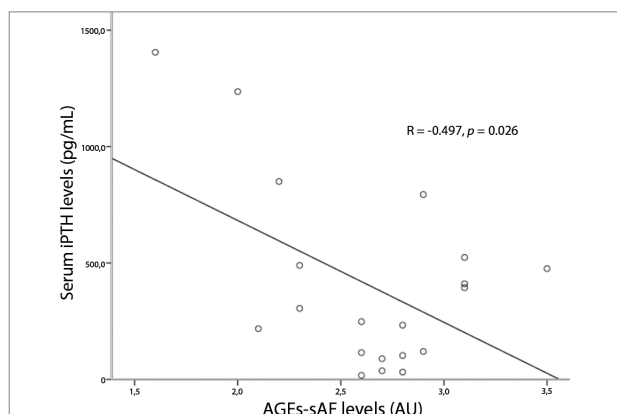
We found a negative correlation between serum iPTH levels and AGEs-sAF levels in patients in HD group ($R = -0.497$; $p = 0.026$) (Figure 1). Parameters

TABLE 2 BIOCHEMICAL AND LABORATORY PARAMETERS ACCORDING TO CONTROL AND HEMODIALYSIS GROUPS

Parameters	Control (n = 24)	HD (n = 20)	<i>p</i>
AGEs-sAF (AU)	2.3 ± 0.4	2.6 ± 0.4	0.031
Glycemia (mg/dL)	86 ± 9	77 ± 23	0.12
Glycated hemoglobin (%)	5.1 ± 0.2	5.1 ± 0.7	0.54
Ferritin (ng/mL)	129 (103-171)	519 (414-750)	0.001
C-reactive protein (mg/dL)	0.2 ± 0.2	1.7 ± 3	0.03
Albumin (g/dL)	4.4 ± 0.2	3.8 ± 0.5	0.001
Total cholesterol (mg/dL)	185 ± 37	145 ± 33	0.001
LDL-cholesterol (mg/dL)	106 ± 29	77 ± 23	0.01
HDL-cholesterol (mg/dL)	54 ± 12	39 ± 13	0.001
Triglycerides (mg/dL)	133 ± 102	143 ± 61	0.68
Uric acid (mg/dL)	4.9 ± 1.2	6.7 ± 1.1	0.001
Urea (mg/dL)	29 ± 7	136 ± 38	0.001
Creatinine (mg/dL)	0.79 ± 0.14	11 ± 2.8	0.001
Hemoglobin (g/dL)	14 ± 1	10.3 ± 1.7	0.001
Hematocrit (%)	43 ± 3	32.2 ± 5	0.001

HD: Hemodialysis; AGEs-sAF: Advanced glycation end products; sAF: Skin autofluorescence; AU: Arbitrary unit; LDL: Low density lipoprotein; HDL: High density lipoprotein.

Figure 1. Relations between advanced glycation end products measured by skin autofluorescence (AGEs-sAF) and serum parathormone levels. AU, arbitrary units.



of CVD and bone and mineral metabolism were also analyzed in HD group as a function of the median of AGEs-sAF levels (i.e., < 2.7 and ≥ 2.7 AU) (Table 3). In this analysis serum iPTH levels in patients with AGEs-sAF < 2.7 AU were almost twofold higher from those with AGEs-sAF ≥ 2.7 AU, although this difference do not reach statistical significance (543 ± 503 vs. 292 ± 246 pg/mL, $p = 0.16$). All others parameters related with bone metabolism, like serum alkaline phosphatase (96 ± 88 vs. 97 ± 43 , $p = 0.98$), total calcium (9 ± 1.2 vs. 9.2 ± 0.5 , $p = 0.65$) and phosphate levels (4.3 ± 1.2 vs. 4.9 ± 2 , $p = 0.46$) were similar. In regard of CVD parameters, interventricular septum (9.7 ± 2.7 vs. 8.2 ± 1 mm, $p = 0.11$), left ventricular mass (193 ± 87 vs. 135 ± 42 g, $p = 0.08$) and vascular calcification score (2 ± 2.5 vs. 1.7 ± 1.9 , $p = 0.76$) did not differ according to median AGEs-sAF levels.

The comparisons between groups revealed that patients in HD group had significantly higher mean AGEs-sAF levels than did control group (2.6 vs. 2.3 ; $p = 0.031$). As expected, most part of traditional cardiovascular risk factors was noted in HD group. For example, they had higher WHR (0.92 ± 0.1 vs. 0.84 ± 0.1 ; $p = 0.009$), systolic blood pressure (132 ± 18 vs. 110 ± 9 ; $p = 0.001$), higher levels of inflammatory markers like serum ferritin [519 (414 – 750) vs. 129 (103 – 171); $p = 0.001$] and C-reactive protein (1.7 ± 3 vs. 0.2 ± 0.2 ; $p = 0.03$), anemia (10.3 ± 1.7 vs. 14 ± 1 ; $p = 0.001$), as well creatinine and urea levels ($p = 0.001$). Despite the presence of three (15%) patients with DM in HD group, no differences was noted on serum glycemia (86 vs. 77 ; $p = 0.12$) and glycated hemoglobin levels (5.1 vs. 5.1 ; $p = 0.54$) between the groups, which could be explained by low prevalence of DM.

DISCUSSION

Our study demonstrates three main findings. First, AGEs-sAF levels ranged according age are elevated both in HD and control groups, although it was significantly higher in HD group. Second, high-flux HD single session did not affect AGEs-sAF levels. Third, AGEs-sAF was negatively associated with serum iPTH levels, the main bone turnover marker used in CKD-MBD management.

AGEs-sAF levels ranged according to age were higher in HD group than control group. This finding was supported by some studies which have demonstrated that AGEs accumulation occurs in uremic patients, independently of the presence of DM or their serum glucose levels.^{3,10,19} Possible mechanisms of this uremic toxin accumulation in ESKD are the reduced metabolic clearance and the increased oxidative stress, in addition to higher rate of reactive carbonyl compounds formation.^{3,20} AGEs tissue accumulation can also explain, at least partially, the aging phenotype of HD patients, since is known that AGEs cause widespread damage to tissues through upregulation of inflammation and cross-linking of collagen and other proteins.²¹

In our study we observed high values of AGEs-sAF, both in healthy and HD subjects, using as reference values obtained from a Dutch study in caucasian population.¹⁸ We cannot exclude that different skin types and eating habits in our healthy subjects (control group) can at least partially, explain these results, since we know that diet-derived AGEs is an important source of this toxins²² and that skin pigmentation can influence AGEs-sAF lecture.⁵ Mook-Kanamori *et al.*²³ demonstrate that the ethnicity exerts influence on AGEs-sAF, with higher levels in Arabs and Filipinos. Limited data exists on sAF in non-caucasian population and in the best of our knowledge, no prior data exist in South Americans, as well in Brazilians sub-groups. More studies including Brazilians are needed to determine if the actual AGEs-sAF values of reference range values are applicable in our population.

In our study, AGEs-sAF pre- and post-HD high flux single session were similar. The use of different HD techniques to counteract AGEs accumulation in HD patients has been investigated, with evidences of free plasma AGEs and AGEs peptides removal by low or high flux HD during a single session. High flux and more frequent HD regime, as daily or home

TABLE 3 CLINICAL, DEMOGRAPHIC, BIOCHEMICAL AND IMAGING CHARACTERISTICS OF HEMODIALYSIS PATIENTS ACCORDING TO MEDIAN AGES-SAF LEVELS

	(n = 20)	AGEs-sAF (AU)		p
		< 2.7 (n = 10)	≥ 2.7 (n = 10)	
Age (years)	38 ± 19	40 ± 24	36 ± 26	0.67
BMI (Kg/m ²)	23.5 ± 6.3	21.3 ± 5.2	25.5 ± 7	0.15
WC (cm)	87.3 ± 17.3	82.1 ± 16.4	91 ± 19	0.30
HD vintage (months)	46 ± 21	42 ± 47	52 ± 53	0.66
Kt/V	1.5 ± 0.61	3 ± 0.5	1.6 ± 0.6	0.3
UF (L)	2.7 ± 0.7	2.6 ± 0.9	2.8 ± 0.8	0.57
Creatinine (mg/dL)	11 ± 2.8	12.4 ± 2.5	10 ± 2.7	0.06
Urea (mg/dL)	136 ± 38	138 ± 54	135 ± 24	0.84
Potassium (mEq/L)	5 ± 0.7	5.3 ± 0.5	4.9 ± 0.7	0.27
Bicarbonate (mmol/L)	18.7 ± 2.7	19.2 ± 3.5	18.3 ± 2.2	0.45
Hematocrit (%)	32.2 ± 5	31.2 ± 6.5	33 ± 3.9	0.50
Calcium (mg/dL)	9.2 ± 0.8	9 ± 1.2	9.2 ± 0.5	0.65
Phosphate (mg/dL)	4.6 ± 1.6	4.3 ± 1.2	4.9 ± 2	0.46
iPTH (pg/mL)	397 ± 385.7	543 ± 503	292 ± 246	0.16
25-OH-D (ng/mL)	36.6 ± 10.9	34.3 ± 11.6	38 ± 11	0.53
ALP (U/L)	95 ± 64	96 ± 88	97 ± 43	0.98
Ferritin (ng/dL)	575 ± 257	620 ± 226	545 ± 296	0.53
CRP (mg/dL)	1.73 ± 3.1	2.9 ± 4.4	0.9 ± 1.1	0.18
Albumin (g/dL)	3.8 ± 0.5	3.7 ± 0.6	3.8 ± 0.3	0.67
Glycose (mg/dL)	77.4 ± 24.9	89 ± 27	68 ± 21	0.07
HbA1c (%)	5.1 ± 0.7	4.9 ± 0.5	5.2 ± 0.8	0.30
IVS (mm)	8.9 ± 2	9.7 ± 2.7	8.2 ± 1	0.11
LV mass (g)	161.4 ± 68	193 ± 87	135 ± 42	0.08
Total cholesterol (mg/dL)	145 ± 33.5	133 ± 22	155 ± 40	0.16
LDL-cholesterol (mg/dL)	77.1 ± 23.5	67 ± 18	84 ± 26	0.12
HDL-cholesterol (mg/dL)	39 ± 13.4	37 ± 15	41 ± 13	0.54
Triglycerides (mg/dl)	143.3 ± 61.7	141 ± 59	148 ± 68	0.82
VC score	1.8 ± 2.1	2 ± 2.5	1.7 ± 1.9	0.76
VC score ≥ 3 (N)	6	3	3	0.62

AGEs: Advanced glycation end products measured by skin autofluorescence; AU: Arbitrary unit; BMI: Body mass index; WC: Waist circumference; HD: Hemodialysis; UF: Ultrafiltration; iPTH: Intact parathormone; 25-OH-D = 25-hydroxyvitamin D; ALP: Alkaline phosphatase; CRP: C-reactive protein; HbA1c = glycated hemoglobin; NR: Not rated; IVS: Interventricular septal thickness; LV: Left ventricular; LDL: low density lipoprotein; HDL: High density lipoprotein; VC: Vascular calcification.

dialysis, has been suggested to be modalities capable of reducing serum AGEs levels in the long-term.^{24,25} However, these previous studies had demonstrated HD influence on plasma AGEs levels, but not on skin accumulation, a tissue with low turnover. Probably, if there is, it is necessary months on HD treatment to note changes in its levels on skin.

It is suggested that AGEs-sAF is an independent predictor of overall and CVD mortality in HD patients.^{4,26} AGEs and their receptor (RAGE) play

an important role in the pathogenesis of vascular damage and cardiovascular disorders, especially in patients with diabetes and CKD. Recently, an *in vivo* study had demonstrated the association of AGEs accumulation in vessel tissues and medial arterial calcification severity in patients with renal failure.²⁷

Despite these evidences in the literature, our subjects in HD group did not shown significantly differences in CV parameters according AGEs-sAF levels, namely, interventricular septum thickness,

left ventricular mass, and vascular or valve calcification. Since AGEs seems to be associated with atherosclerosis, further studies including carotid ultrasound in HD population can improve findings of vascular calcification. Furthermore, the present study did not associated AGEs-sAF to metabolic stress markers, glycated hemoglobin, C-reactive protein and hyperlipidemia, in opposition to previous studies, probably due our study sample size.^{5,28}

AGEs negative effects on bone tissue have been described since is known your association with osteoporosis.²⁹ Many studies using cell culture experiments have been done to clarify AGEs effects on bone tissue, demonstrating multiple possible mechanisms as following: stimulating osteoblasts apoptosis,³⁰ impairing growth factors or osteogenic cells adhesion to bone matrix,¹¹ inhibiting osteoblastic differentiation,³¹ stimulating osteoblasts to secrete bone-resorbing cytokines,³² and enhancing osteoclast bone resorption.³³

Recently, is speculate AGEs participation on CKD-MBD pathophysiology, mainly in adynamic bone disease.³⁴ Yamamoto *et al.*¹³ had described that AGEs can inhibit osteoblastic activity and parathyroid hormone secretion in response to hypocalcemia. In our study we detected a negative correlation of AGEs -sAF with serum iPTH, suggesting a role of AGEs on the pathophysiology of bone disease in HD prevalent patients. These findings must be confirmed in future studies with bone biopsy and serum dosage of AGEs to clarify AGEs effect on CKD-MBD.

This pilot study has several limitations. Potential influences of ethnicity and diet limit definitive conclusions. In addition, we did not have performed AGEs analysis on serum or bone histomorphometry studies. However, to the best of our knowledge, this is the first Brazilian study performed in HD patients using sAF to analyze AGEs tissue accumulation and their relations with CVD parameters and markers of bone metabolism.

In conclusion, AGEs-sAF levels were higher in HD group than control. Surprisingly, some apparently healthy subjects had high AGEs-sAF levels expected according to their age. Single high-flux HD session seems not affect AGEs-sAF levels. A negative relation between AGEs-sAF levels and serum iPTH levels was observed suggesting a role of AGEs on the pathophysiology of bone disease in prevalent HD patients. The nature of this relation and the clinical application of this non-invasive methodology for

evaluation AGEs deposition must be confirmed and clarified in future studies.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors declare that this research received no specific grant from any funding agency and acknowledge J.B. Lopes de Faria (Renal Pathophysiology Laboratory, Investigation on Diabetes Complications, School of Medical Sciences, University of Campinas (Unicamp), Campinas, Brazil) which has supplied the instrument AGE-Reader.

REFERENCES

1. National Kidney Foundation. Improving Global Outcomes (KDIGO) CKD Work Group. KDIGO 2012 Clinical Practice Guideline for the Evaluation and Management of Chronic Kidney Disease. *Kidney Int Suppl.* 2013;3:4-150.
2. Foley RN, Parfrey PS, Sarnak MJ. Clinical epidemiology of cardiovascular disease in chronic renal disease. *Am J Kidney Dis* 1998;32:S112-9. PMID: 9820470 DOI: <http://dx.doi.org/10.1053/ajkd.1998.v32.pm9820470>
3. Arsov S, Graaff R, van Oeveren W, Stegmayr B, Sikole A, Rakhorst G, et al. Advanced glycation end-products and skin autofluorescence in end-stage renal disease: a review. *Clin Chem Lab Med* 2014;52:11-20. DOI: <http://dx.doi.org/10.1515/cclm-2012-0832>
4. Meerwaldt R, Hartog JW, Graaff R, Huisman RJ, Links TP, den Hollander NC, et al. Skin autofluorescence, a measure of cumulative metabolic stress and advanced glycation end products, predicts mortality in hemodialysis patients. *J Am Soc Nephrol* 2005;16:3687-93. DOI: <http://dx.doi.org/10.1681/ASN.2005020144>
5. Meerwaldt R, Graaff R, Oomen PHN, Links TP, Jager JJ, Alderson NL, et al. Simple non-invasive assessment of advanced glycation endproduct accumulation. *Diabetologia* 2004;47:1324-30. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00125-004-1451-2>
6. Mulder DJ, van Haelst PL, Gross S, de Leeuw K, Bijzet J, Graaff R, et al. Skin autofluorescence is elevated in patients with stable coronary artery disease and is associated with serum levels of neopterin and the soluble receptor for advanced glycation end products. *Atherosclerosis* 2008;197:217-23. PMID: 17499742 DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2007.03.027>
7. Lutgers HL, Graaff R, de Vries R, Smit AJ, Dullaart RP. Carotid artery intima media thickness associates with skin autofluorescence in non-diabetic subjects without clinically manifest cardiovascular disease. *Eur J Clin Invest* 2010;40:812-7. PMID: 20597962 DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2362.2010.02329.x>
8. Noordzij MJ, Lefrandt JD, Loeffen EA, Saleem BR, Meerwaldt R, Lutgers HL, et al. Skin autofluorescence is increased in patients with carotid artery stenosis and peripheral artery disease. *Int J Cardiovasc Imaging* 2012;28:431-8. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s10554-011-9805-6>
9. den Dekker MA, Zwieters M, van den Heuvel ER, de Vos LC, Smit AJ, Zeebregts CJ, et al. Skin autofluorescence, a non-invasive marker for AGE accumulation, is associated with the degree of atherosclerosis. *PLoS One* 2013;8:e83084. DOI: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0083084>
10. Tanaka K, Tani Y, Asai J, Nemoto F, Kusano Y, Suzuki H, et al. Skin autofluorescence is associated with renal function and cardiovascular diseases in pre-dialysis chronic kidney disease patients. *Nephrol Dial Transplant* 2011;26:214-20. DOI: <http://dx.doi.org/10.1093/ndt/gfq369>

11. Fong Y, Edelstein D, Wang EA, Brownlee M. Inhibition of matrix-induced bone differentiation by advanced glycation end-products in rats. *Diabetologia* 1993;36:802-7. PMID: 8405750 DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/BF00400353>
12. Notsu M, Yamaguchi T, Okazaki K, Tanaka K, Ogawa N, Kanazawa I, et al. Advanced glycation end products inhibit the mineralization of mouse stromal ST2 cells by binding the receptor for ages and increasing TGF- β expression and secretion. *J Bone Miner Res.* 2013;28:2402-10. Available from: <http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&from=export&id=L71507582&nhttp://rug.on.worldcat.org/atoztitles/link/?sid=EMBASE&issn=08840431&id=doi:&catitle=Advanced+glycation+end+products+inhibit+the+mineralization+of+mouse+stromal+ST2+cells+b>
13. Yamamoto T, Ozono K, Miyauchi A, Kasayama S, Kojima Y, Shima M, et al. Role of advanced glycation end products in adynamic bone disease in patients with diabetic nephropathy. *Am J Kidney Dis* 2001;38:S161-4. PMID: 11576945 DOI: <http://dx.doi.org/10.1053/ajkd.2001.27428>
14. Herberth J, Monier-Faugere MC, Mawad HW, Branscum AJ, Herberth Z, Wang G, et al. The five most commonly used intact parathyroid hormone assays are useful for screening but not for diagnosing bone turnover abnormalities in CKD-5 patients. *Clin Nephrol* 2009;72:5-14. PMID: 19640382 DOI: <http://dx.doi.org/10.5414/CNP72005>
15. Fitzpatrick TB. The validity and practicality of sun-reactive skin types I through VI. *Arch Dermatol* 1988;124:869-71. PMID: 3377516 DOI: <http://dx.doi.org/10.1001/archderm.1988.01670060015008>
16. Adragão T, Pires A, Lucas C, Birne R, Magalhaes L, Gonçalves M, et al. A simple vascular calcification score predicts cardiovascular risk in haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant* 2004;19:1480-8. DOI: <http://dx.doi.org/10.1093/ndt/gfh217>
17. Kannel WB, McGee D, Gordon T. A general cardiovascular risk profile: the Framingham Study. *Am J Cardiol* 1976;38:46-51. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/0002-9149\(76\)90061-8](http://dx.doi.org/10.1016/0002-9149(76)90061-8)
18. Koetsier M, Lutgers HL, de Jonge C, Links TP, Smit AJ, Graaff R. Reference values of skin autofluorescence. *Diabetes Technol Ther* 2010;12:399-403. DOI: <http://dx.doi.org/10.1089/dia.2009.0113>
19. Miyata T, Wada Y, Cai Z, Iida Y, Horie K, Yasuda Y, et al. Implication of an increased oxidative stress in the formation of advanced glycation end products in patients with end-stage renal failure. *Kidney Int* 1997;51:1170-81. PMID: 9083283 DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/ki.1997.160>
20. Agalou S, Ahmed N, Babaei-Jadidi R, Dawney A, Thornalley PJ. Profound mishandling of protein glycation degradation products in uremia and dialysis. *J Am Soc Nephrol* 2005;16:1471-85. DOI: <http://dx.doi.org/10.1681/ASN.2004080635>
21. Semba RD, Nicklett EJ, Ferrucci L. Does accumulation of advanced glycation end products contribute to the aging phenotype? *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2010;65:963-75. PMID: 20478906
22. Uribarri J, Cai W, Sandu O, Peppas M, Goldberg T, Vlassara H. Diet-derived advanced glycation end products are major contributors to the body's AGE pool and induce inflammation in healthy subjects. *Ann N Y Acad Sci* 2005;1043:461-6. PMID: 16037267
23. Mook-Kanamori MJ, Selim MM, Takiddin AH, Al-Homsi H, Al-Mahmoud KA, Al-Obaidli A, et al. Ethnic and gender differences in advanced glycation end products measured by skin autofluorescence. *Dermatoendocrinol* 2013;5:325-30. DOI: <http://dx.doi.org/10.4161/derm.26046>
24. Stein G, Franke S, Mahiout A, Schneider S, Sperschneider H, Borst S, et al. Influence of dialysis modalities on serum AGE levels in end-stage renal disease patients. *Nephrol Dial Transplant* 2001;16:999-1008. DOI: <http://dx.doi.org/10.1093/ndt/16.5.999>
25. Arsov S, Trajceska L, van Oeveren W, Smit AJ, Dzekova P, Stegmayr B, et al. Increase in skin autofluorescence and release of heart-type fatty acid binding protein in plasma predicts mortality of hemodialysis patients. *Artif Organs* 2013;37:E114-22. DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/aor.12078>
26. Floridi A, Antolini F, Galli F, Fagugli RM, Floridi E, Buon cristiani U. Daily haemodialysis improves indices of protein glycation. *Nephrol Dial Transplant* 2002;17:871-8 DOI: <http://dx.doi.org/10.1093/ndt/17.5.871> DOI: <http://dx.doi.org/10.1093/ndt/17.5.871>
27. Janda K, Krzanowski M, Gajda M, Dumnicka P, Jasek E, Fedak D, et al. Vascular effects of advanced glycation end-products: content of immunohistochemically detected AGEs in radial artery samples as a predictor for arterial calcification and cardiovascular risk in asymptomatic patients with chronic kidney disease. *Dis Markers* 2015;2015:153978. PMID: 25852219 DOI: <http://dx.doi.org/10.1155/2015/153978> DOI: <http://dx.doi.org/10.1155/2015/153978>
28. Nagano M, Fukami K, Yamagishi S, Sakai K, Kaida Y, Matsumoto T, et al. Tissue level of advanced glycation end products is an independent determinant of high-sensitivity C-reactive protein levels in haemodialysis patients. *Nephrology (Carlton)* 2011;16:299-303. DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1440-1797.2010.01419.x> DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1440-1797.2010.01419.x>
29. Yamagishi S. Role of advanced glycation end products (AGEs) in osteoporosis in diabetes. *Curr Drug Targets* 2011;12(14):2096102. DOI: <http://dx.doi.org/10.2174/138945011798829456> DOI: <http://dx.doi.org/10.2174/138945011798829456>
30. Alikhani M, Alikhani Z, Boyd C, MacLellan CM, Raptis M, Liu R, et al. Advanced glycation end products stimulate osteoblast apoptosis via the MAP kinase and cytosolic apoptotic pathways. *Bone* 2007;40:345-53. PMID: 17064973 DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bone.2006.09.011> DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bone.2006.09.011>
31. Okazaki K, Yamaguchi T, Tanaka K, Notsu M, Ogawa N, Yano S, et al. Advanced glycation end products (AGEs), but not high glucose, inhibit the osteoblastic differentiation of mouse stromal ST2 cells through the suppression of osterix expression, and inhibit cell growth and increasing cell apoptosis. *Calcif Tissue Int* 2012;91:286-96.
32. Miyata T, Kawai R, Taketomi S, Sprague SM. Possible involvement of advanced glycation end-products in bone resorption. *Nephrol Dial Transplant* 1996;11:54-7.
33. Miyata T, Notoya K, Yoshida K, Horie K, Maeda K, Kurokawa K, et al. Advanced glycation end products enhance osteoclast-induced bone resorption in cultured mouse unfractionated bone cells and in rats implanted subcutaneously with devitalized bone particles. *J Am Soc Nephrol* 1997;8:260-70.
34. Yamamoto T, Ozono K. Role of advanced glycation endproducts in adynamic bone disease. *Clin Calcium* 2001;11:1044-7.

7.4. Anexo IV: Artigo submetido para publicação no periódico Nephrology Dialysis and Transplantation

This is the overview page

**ADVANCED GLYCATION END PRODUCTS ASSESSMENT
 USING SKIN AUTOFLUORESCENCE, SERUM OR DIET INTAKE:
 WHICH MEASUREMENT BEST RELATES TO OSTEOPOROSIS
 AND VASCULAR CALCIFICATION IN CHRONIC KIDNEY
 DISEASE?**

Journal:	<i>Nephrology Dialysis Transplantation</i>
Manuscript ID	NDT-01306-2017
Manuscript Type:	Original Article - Clinical Research
Date Submitted by the Author:	31-Aug-2017
Complete List of Authors:	<p>Quadros, Kélcia; State University of Campinas (UNICAMP), Department of Internal Medicine (Nephrology)</p> <p>Esteves, André ; State University of Campinas (UNICAMP), Department of Internal Medicine (Nephrology),</p> <p>França, Renata; State University of Campinas (UNICAMP), Department of Internal Medicine (Nephrology),</p> <p>Borges, Cinthia; State University of Campinas (UNICAMP), Department of Internal Medicine (Nephrology),</p> <p>Borges, Cynthia; State University of Campinas, Department of Internal Medicine - Faculty of Medical Sciences</p> <p>Watanabe, Marcela; Botucatu School of Medicine, Sao Paulo University, UNESP, Department of Internal Medicine</p> <p>da Silva, Maryanne; Botucatu School of Medicine, Sao Paulo University, UNESP, Department of Internal Medicine</p> <p>Roza, Noemí ; State University of Campinas, Department of Internal Medicine (Nephrology),</p> <p>Jorgetti, Vanda; University of Sao Paulo Medical School, Nephrology</p> <p>Caramori, Jacqueline; Botucatu School of Medicine, Sao Paulo University, UNESP, Department of Internal Medicine</p> <p>de Oliveira, Rodrigo; State University of Campinas (UNICAMP), Department of Internal Medicine, Division of Nephrology</p>
Keyword list:	Advanced glycation end products, chronic kidney diseases, Vascular calcification, osteoporosis, bone mineral density

Campinas, August 31th, 2017

Denis FOUQUE, M.D.
Editor-in-Chief
Nephrology Dialysis and Transplantation

Dear Dr. FOUQUE,

We are submitting a manuscript entitled “Advanced Glycation End Products Assessment Using Skin Autofluorescence, Serum or Diet Intake: Which Measurement Best Relates to Osteoporosis and Vascular Calcification in Chronic Kidney Disease?” to be considered for publication as an original article in *Nephrology Dialysis and Transplantation*.

Advanced glycation end products (AGEs) likely play a role in vascular calcification (VC) and bone loss in CKD, but the mechanisms have not been fully elucidated. The available clinical studies did not simultaneously evaluate patients in different stages of CKD, and a comprehensive AGEs evaluation, including serum, AGEs intake and AGEs using skin autofluorescence (sAF), was never performed.

Our study evaluated the relationship between AGEs (as sAF, serum and intake), bone loss and VC in 80 CKD patients on conservative management, hemodialysis or peritoneal dialysis. We demonstrated that AGEs-sAF levels were elevated in CKD patients, despite a lower intake of AGEs. Patients exhibited similar AGEs-sAF levels irrespective of CKD stage or treatment, which suggests that the deposition of AGEs is an early event in CKD. AGEs-sAF levels, but not serum levels or daily intake, were related to VC, cardiac risk and a reduction in bone mass. Finally, AGEs-sAF levels were an independent predictor for VC, and an increase of 1 unit of AGEs-sAF resulted in 3.5-fold increased odds of having linear VC.

The results presented in this paper have not been published previously. There are no personal conflicts of interest to disclose. All of the undersigned authors participated actively in the study and have agreed to its submission to *Nephrology Dialysis and Transplantation*. Sincerely,



Rodrigo Bueno de Oliveira, M. D., Ph.D. - on behalf of the co-authors

ADVANCED GLYCATION END PRODUCTS ASSESSMENT USING SKIN AUTOFLUORESCENCE, SERUM OR DIET INTAKE: WHICH MEASUREMENT BEST RELATES TO OSTEOPOROSIS AND VASCULAR CALCIFICATION IN CHRONIC KIDNEY DISEASE?

Authors:

Kélcia R. S. Quadros^{1,2*}, M. D.; André B. A. Esteves^{1,2*}, M. D.; Renata A. França^{1,2}, M. D.; Noemí N. V. Roza¹, B. Sc., Ph. D.; Cinthia E. M. Carbonara^{1,2}, M. D.; Cynthia M. Borges², M. D.; Marcela Watanabe³, C. C. N; Maryanne Z. C. da Silva³, C. C. N.; Vanda Jorgetti⁴, M. D.; Ph. D.; Jacqueline T. Caramori³ M. D., Ph.D.; Rodrigo B. de Oliveira^{1,2}, M. D., Ph. D.

*These authors have contributed equally for the present study.

Affiliations:

1. Laboratory for Evaluation of Mineral and Bone Disorder in Nephrology (LEMON) – School of Medical Sciences, University of Campinas (UNICAMP), Campinas, Brazil.
2. Department of Internal Medicine (Nephrology) – School of Medical Sciences, University of Campinas (UNICAMP), Campinas, Brazil.
3. Department of Internal Medicine, Nephrology Division, Botucatu Medical School, São Paulo State University (UNESP), Botucatu, Brazil.
4. Department of Internal Medicine, Nephrology Division, University of São Paulo (USP), São Paulo, Brazil.

Correspondence:

Rodrigo BUENO DE OLIVEIRA, Laboratory for Evaluation of Mineral and Bone Disorder in Nephrology (LEMON), School of Medical Sciences, University of Campinas (UNICAMP), Campinas, Brazil. Rua Vital Brasil, nº 300, Cidade Universitária. Campinas, SP, Brazil. Postal Code: 13083-888. Tel.: +55 19 3521-7279. E-mail: rodrigobueno.hc@gmail.com

Abstract

Background: Advanced glycation end products (AGEs) may be related to vascular calcification (VC) and bone loss in chronic kidney disease (CKD) patients. However, the role of AGEs in different CKD stages is unknown. We evaluated the relationships among AGEs detected via skin autofluorescence (sAF), serum and dietary intake, and metabolic and structural parameters of bone and cardiovascular disease, including VC evaluation. **Methods:** Eighty patients on conservative management, hemodialysis or peritoneal dialysis underwent evaluation of AGEs-sAF levels, serum N-carboxymethyllysine (CML), and dietary AGEs intake. AGEs-sAF levels in patients were compared to AGEs-sAF levels in healthy subjects (N=37). **Results:** CKD patients exhibited higher mean AGEs-sAF levels than controls (3.0 ± 0.6 vs. 2.4 ± 0.4 ; $p=0.0001$) despite lower total AGEs intake ($9,518 \pm 4,666$ vs. $11,943 \pm 5,581$ kU/day; $p=0.026$). High AGEs-sAF levels were detected in patients with VC ($p=0.03$) and in those with reduced bone mineral density (BMD) ($p = 0.03$). Linear regression confirmed a significant relationship between AGEs-sAF and age ($p<0.0001$), diagnosis of osteopenia or osteoporosis ($p=0.008$) and Framingham score risk ($p=0.001$). Multivariate linear regression and logistic regression analyses revealed AGEs-sAF, age and body mass index were independent determinants of VC ($ps=0.01, 0.01$ and 0.02 , respectively). **Conclusion:** AGEs-sAF levels were elevated in CKD patients despite lower AGEs intake and irrespective of CKD stage or treatment. AGEs-sAF levels, not serum CML levels or daily intake, were related to VC, cardiac risk and reduced BMD. AGEs-sAF level was an independent predictor of VC. An increase of 1 AGEs-sAF unit resulted in 3.5-fold increased odds of having linear VC.

Keywords: advanced glycation end products; chronic kidney disease; vascular calcification; osteoporosis; bone mineral density

INTRODUCTION

Mineral and bone disorders (MBD) are a major complication of chronic kidney disease (CKD) and is related to high burden mortality [1-3]. Clinical and experimental evidence have demonstrated a close relationship between a reduction in bone mineral density (BMD) and vascular calcification (VC), which is an independent predictor of death [4-6]. Hemodialysis (HD) patients exhibit an inverse relationship between bone volume and coronary arterial calcification score [7]. The progression of VC is also associated with bone loss in non-dialyzed CKD patients [8].

Many authors have studied the pathophysiology of bone loss and VC in CKD patients. However, the mechanisms remain only partially elucidated, and new approaches directed toward modulation of the factors involved are needed. Recent attention has been focused on the study of uremic environment and uremic toxins (UT) that may interact negatively with many biological functions [9, 10].

Advanced glycation end products (AGEs) are a type of UT that are formed via non-enzymatic glycation reactions between reducing sugars and amino acids, lipids or DNA. The elevation of serum AGEs levels in CKD patients is attributed to decreased renal clearance, increased oxidative stress and/or dietary intake. However, the effects of these compounds on bone and the cardiovascular system in various CKD stages are poorly studied [11-13].

AGEs accumulation in tissue is a contributing factor to atherosclerosis in humans, but its impact on VC is less clear [14-17]. In rodents with VC, AGEs were observed on the elastin and collagen matrix in the femoral arteries

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

[18]. Some studies have described the involvement of AGEs in VC in CKD patients, which suggests that AGEs accumulation may play a role in VC development and progression [19-21].

Some evidence suggests a link between AGEs and osteoporosis [22, 23]. Elevated plasma AGEs levels were associated with impaired bone formation in postmenopausal women [24]. The proposed mechanisms involve a disrupted production of bone matrix proteins and apoptosis and disturbances in osteoblast differentiation, proliferation and bone mineralization [25].

The interest to evaluate the relationships among AGEs, VC and bone is amplified because this UT may be modulated via dietary interventions and dialytic strategies, which would provide a new treatment target [26-29]. The accumulation of AGEs in tissues can be indirectly measured using skin autofluorescence (sAF). This methodology is non-invasive, may be repeated many times, and has been validated in patients with CKD [30, 31].

Clinical studies that have evaluated AGEs did not evaluate patients in different stages of CKD, including patients undergoing conservative management, HD and peritoneal dialysis (PD). A comprehensive AGEs evaluation, including measurements of serum AGEs levels, dietary AGEs intake and AGEs-sAF, is not available. Studies using measurements of AGEs-sAF in CKD patients did not include control groups for comparison. This lack of comparison is an important issue because ethnicity and regional factors influence AGEs-sAF levels.

In the present clinical study, we evaluated the relationships among AGEs, bone and cardiovascular disease in patients with different stages of CKD (i.e., CKD 3-4, HD and PD). We measured AGEs levels by sAF, serum N-carboxymethyllysine (CML) levels, and quantification of daily AGEs intake.

MATERIALS AND METHODS

Study design and patient selection

Eighty patients with different CKD stages were enrolled in this observational, controlled, double-center study from February 2016 to March 2017. Patients were recruited from the Nephrology Department's outpatient clinics at the Hospital de Clínicas of University of Campinas (UNICAMP) and State University of São Paulo (UNESP) and divided into the following groups: CKD 3-4 (N=20), HD (N=32) and DP (N=28).

Inclusion criteria were age > 18 years old, CKD stages 3-4 according to *Kidney Disease Outcomes Quality (KDIGO)*, and undergoing chronic HD or PD treatment (> 3 months). Exclusion criteria were the presence of chronic inflammatory disease, primary hyperparathyroidism, kidney transplantation, an acute cardiovascular event in the 3 months prior to screening for inclusion, cognitive impairment, cancer, HIV and clinical instability. Patients in the HD group were on chronic HD treatment 3 times weekly, 4 hours/session, using high-flux and high-efficiency polysulfone dialyzers. Patients in the PD group were receiving chronic PD treatment [automated PD (N=18) or continuous ambulatory PD (N=10)].

AGEs-sAF levels in all CKD patients were compared to AGEs-sAF levels from apparently normal healthy subjects (Control group, N=37) who met the following criteria: age between 20 and 70 years; serum creatinine <1.2 mg/dL and albumin >3.5 mg/dL; no diagnosis of *diabetes mellitus* (DM) or chronic inflammatory disease, not pregnant or using medicines that affect bone metabolism (i.e., anticonvulsants, bisphosphonates, calcimimetics, calcitonin, native vitamin D, dicumarinic and hormone replacement therapy). Written informed consent was obtained from all subjects and patients, and the local ethics committee approved the study protocol under numbers CAAE 38108314.6.0000.5404-45943115.9.0000.5404-45777015.5.0000.5404.

Measurement of AGEs-sAF and serum AGEs levels (carboxymethyllysine)

AGEs skin deposition was evaluated by sAF using the AGE-Reader™ (DiagOptics BV, Groningen, The Netherlands), according to the supplier's recommendations. This device measures emitted fluorescence from skin that is influenced by the deposition of AGEs. The device calculates the ratio between emitted and reflected excitation light. AGEs-sAF levels were expressed in arbitrary units (AU). AGEs-sAF levels were measured in triplicate on the ventral side of the forearm, and the mean values were used for all statistical analyses. Areas with arterial-venous fistulas, scars, and tattoos were avoided. All measurements were performed in a room with windows covered by curtains to avoid sun illumination (semi-dark) and a controlled temperature (22°C).

1
2
3 Serum carboxymethyllysine (CML) levels, which is one of the most
4 common circulating AGEs in serum, were measured with an enzyme-linked
5 immunosorbent assay (ELISA) provided by Shanghai Blue Gene Biotech Co.,
6 Ltd. (E01C0773), according to the manufacturer's instructions. The detection
7 range was 5 to 100 ng/mL, and the sensitivity was > 1.0 ng/mL.
8
9

10 11 12 13 14 *Evaluation of dietary AGEs intake (total and fractions)* 15

16
17 AGEs intake was estimated from a 3-day food record. Healthy subjects
18 or patients and/or their caregivers were instructed to register all food and
19 drinks consumed, provide information on food preparation methods and
20 ingested amounts. The subjects were advised not to change their usual
21 dietary intake during the 3 days in quality, quantity and cooking methods.
22 Registered data were converted into standardized food weight or volume.
23 Total AGEs and fractions of methylglyoxal (MG) and CML were estimated
24 based on data from Uribarri *et al.* [27].
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35

36 37 38 *Cardiovascular disease and risk assessment* 39

40
41 Cardiovascular disease (CVD) and risk assessment were assessed
42 based on clinical history, serum biochemistry analysis and imaging studies.
43 The interview focused on comorbidities and history of myocardial infarction,
44 stroke, heart failure, angina pectoris or surgical procedures for angina or
45 coronary/peripheral artery disease, including percutaneous transluminal
46 angioplasty. Healthy subjects and patients were classified according
47 Framingham risk score [32]. Risk for CVD was also determined using AGEs-
48 sAF levels stratified by age as proposed by Koetsier *et al.* [33].
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Transthoracic echocardiogram, X-ray plain films for VC detection and ankle-brachial index (ABI) measurements were performed in patients. Data, such as fraction ejection, left ventricular mass, valve calcification and interventricular septum thickness, were analyzed. The presence of VC was evaluated from X-ray plain films of the pelvis, hands and lateral abdominal incidence (aorta) using scores proposed by Adragão *et al.* and Kauppila *et al.* [34, 35]. Briefly, radiographic films of the pelvis and hands were divided into four sections using two imaginary lines: a horizontal line over the upper limit of both femoral heads and a median vertical line over the vertebral column or by a horizontal line over the upper limit of the metacarpal bones. The presence of linear VC in each section was counted as “1”, and its absence was “0” (Adragão *et al.*). Calcium (Ca) deposits in the anterior and posterior walls of the aorta parallel to vertebra L1 to L4 were visualized as scattered or linear areas of high density (Kauppila *et al.*). These lesions were scored separately for the anterior and posterior walls and graded as follows: “0” = no aortic Ca deposits; 1= small scattered Ca deposits filling less than one-third of the longitudinal wall of the aorta; 2 = one-third to two-thirds of the longitudinal wall of the aorta calcified; or 3 = greater than two-thirds of the longitudinal wall of the aorta calcified. The following arteries were evaluated: aorta, iliac, femoral, radial, ulnar and digital. Two observers independently analyzed X-ray plain films. A third observer issued an opinion in cases of doubt, and the most prevalent opinion was chosen.

The ankle-brachial index (ABI) was measured as follows. Patients rested for 5-minutes in the supine position, and a Doppler ultrasound (10 MHz, MEDMEGA Medical Equipment, Inc., São Paulo, Brazil) was used to

1
2
3 detect systolic blood flow. An adult standard cuff was first inflated until blood
4 flow on Doppler ceased and deflated slowly until the flow signal reappeared.
5
6 Blood pressure was measured in the upper limbs (brachial arteries) and lower
7 limbs (*dorsalis pedis* and posterior tibial arteries). Areas with arteriovenous
8 fistulas were avoided in the HD group. ABI was obtained by dividing the
9 highest systolic blood pressure obtained in the arteries of the lower limb by
10 the highest systolic blood pressure obtained in the upper limb. The reference
11 ranges were ≤ 0.9 or ≥ 1.4 for abnormal ABI and 0.91 to 1.39 for normal ABI
12 [36].
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22

23 *Bone and mineral metabolism assessment*

24
25 BMD was assessed using dual-energy X-ray absorptiometry (DXA) of
26 lumbar spine, total femur, femoral neck and distal radius using a lunar prodigy
27 densitometer, standard densitometry protocols and analysis software provided
28 by the manufacturer (Hologic Discovery Wi, Bedford, Marlborough, USA). The
29 worst of the four evaluated regions was chosen for the classification of a
30 patient's BMD as "normal", "osteopenia" or "osteoporosis" according to their
31 age. BMD was expressed as a T-score for comparisons of subjects with
32 young-normal population. Osteopenia was defined as a T-score ≤ -1.5 and $\geq -$
33 2.4 S.D., and osteoporosis was defined as a T-score ≤ -2.5 S.D.
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45

46 Serum iPTH levels (reference range: 15 to 65 pg/mL) were measured
47 using a chemiluminescence assay (Liaison N-tact PTH CLIAR, Diasorin,
48 Stillwater, USA). Serum 25-hydroxyvitamin D levels (reference range 30 to
49 100 ng/dL; insufficiency < 30 ng/dL and deficiency < 10 ng/dL) were
50 measured using a chemiluminescence method. Alkaline phosphatase (AP)
51 (reference range: 30 to 120 IU/L) was measured using a kinetic, colorimetric
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

test (Beckman Coulter OSR6104). Serum calcium (Ca) and phosphate (P) levels and a general serum biochemistry profile were assayed in an on-site biochemistry laboratory using standard auto-analyzer techniques. Blood samples were collected on a previously scheduled date for healthy subjects and the CKD 3-4 and DP groups. Blood samples of HD patients were collected immediately before the second HD session of the week.

Statistical analysis

Data are expressed as the means \pm S.D., medians and interquartile ranges or frequencies, as appropriate. Intergroup comparisons were performed using a χ^2 test for categorical variables and Student's t-test or a Mann–Whitney test for continuous variables. Pearson's correlation coefficient or Spearman's rank correlation was used to assess the relationships between AGEs-sAF and selected clinical or biochemical variables. A univariate regression and multivariate stepwise linear regression or logistic regression analysis were performed to identify variables correlated with AGEs-sAF levels, VC and BMD. Variables selected in an univariate regression, i.e., sex, age, smoking, DM, body mass index, glomerular filtration rate by CKDEPI equation, serum AP, iPTH levels, BMD and sevelamer use, were included in a multivariate model for determinants of AGEs-sAF and osteoporosis. Age, smoking, DM, body mass index, ABI, glomerular filtration rate by CKDEPI equation, AGEs-sAF levels, serum AP, CML, P, iPTH levels, BMD, sevelamer use, dietary total AGEs intake and dietary CML intake were included in the multivariate model for determinants of VC.

The threshold for statistical significance was $P < 0.05$. All statistical analyses were performed using SPSS software (version 17.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

RESULTS

The CKD population exhibited higher mean AGEs-sAF levels than healthy subjects (3.0 ± 0.6 vs. 2.4 ± 0.4 ; $p = 0.0001$), despite lower total AGEs intake ($9,518 \pm 4,666$ vs. $11,943 \pm 5,581$ kU/day; $p = 0.026$). No significant differences in AGEs-sAF levels were noted in the CKD subgroups (CKD 3-4, HD and PD) (Figure 1).

Tables 1 and 2 show baseline characteristics, serum biochemistry and imaging findings of all CKD populations and subgroups. Patients with CKD 3-4 exhibited higher serum hemoglobin and lower iPTH, AP, and P levels than HD or PD patients. Patients in the PD group exhibited lower serum calcidiol and Ca levels and higher serum CML levels and Framingham risk scores than the other groups.

Relationships between AGEs-sAF, vascular calcification and bone mineral density

High AGEs-sAF levels were detected in patients with VC (3.3 ± 0.6 vs. 2.8 ± 0.6 ; $p = 0.03$) and reduced bone mass (detected by DXA) (3.1 ± 0.6 vs. 2.6 ± 0.4 ; $p = 0.03$) (Figure 2).

AGEs-sAF levels correlated with age ($R = 0.465$; $p = 0.0001$), serum total cholesterol levels ($R = 0.284$; $p = 0.021$), T-score using DXA ($R = -0.354$;

p = 0.009) and Framingham score (R = 0.424; p = 0.001). The results of linear regression confirmed a significant relationship between AGEs-sAF and age (p < 0.0001), diagnosis of osteopenia or osteoporosis (using DXA) (p < 0.008), T-score (p = 0.009) and Framingham score (0.001) (Figure 3). AGEs-sAF levels indicated that 35 (44%) patients in the CKD group were classified as high risk for cardiovascular mortality compared to only 6 (16%) healthy subjects (p = 0.0005).

Multivariate stepwise linear regression and logistic regression analyses were performed to identify determinants of AGEs-sAF levels and the presence of linear VC. Age and active or prior smoking were independent predictors of AGEs-sAF levels (p = 0.002 and 0.036, respectively). AGEs-sAF, age and body mass index were independent predictors of VC (p = 0.01, 0.01 and 0.02, respectively) (Table 3). No variable was identified as an independent predictor of osteopenia or osteoporosis.

Figure 4 depicts two different patients. One patient presented with elevated AGEs-sAF levels, severe osteoporosis and extensive areas of VC, and the other patient presented with AGEs-sAF levels near the reference range for her age, normal BMD and no areas of VC.

Relationship of AGEs intake with ankle-brachial index and C-reactive protein

Total dietary AGEs intake positively correlated with respective fractions of dietary AGEs [CML intake (R = 0.56; p = 0.0001), MG intake (R = 0.43; p = 0.0001)] and ABI (R = 0.28; p = 0.02). Dietary CML intake correlated with serum C-reactive protein levels (R = 0.35; p = 0.005).

Relationship of serum CML levels, diabetes mellitus, and ultrafiltration in dialytic patients

Serum CML levels negatively correlated with ultrafiltration per session in CKD patients under HD or PD ($R = -0.332$; $p = 0.014$) and albumin levels ($R = -0.327$; $p = 0.004$). A linear regression analysis revealed a significant relationship between serum CML levels and DM ($p = 0.03$).

CKD subgroup analysis

AGEs-sAF levels in the CKD 3-4 subgroup were positively correlated with interventricular septum thickness ($R = 0.567$; $p = 0.018$), and these levels were an independent predictor of interventricular septum thickness ($p = 0.03$). Linear regression revealed the absence of diuresis as an independent predictor of high serum CML levels in the HD subgroup ($p = 0.003$). AGEs-sAF and serum iPTH levels were independent predictors of ejection fraction ($p = 0.027$ and 0.04 , respectively). Total AGEs intake was a determinant of high serum CML levels in the PD subgroup ($p = 0.01$). Serum CML levels were not associated with cumulative glucose load from the use of PD solutions over time. No significant differences in AGEs intake were noted between CKD subgroups (CKD 3-4, HD and PD) (Table 2).

DISCUSSION

The present study had four main findings. First, AGEs-sAF levels are elevated in patients with different stages of CKD, despite a lower AGEs intake. Second, patients exhibited similar AGEs-sAF levels irrespective of

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

CKD stage or dialysis treatment, which suggests that the deposition of AGEs is an early event in CKD. Third, AGEs-sAF levels, but not serum CML levels or daily AGEs intake, are related to the presence of VC, cardiac risk and reduction in bone mass. Finally, AGEs-sAF levels are an independent predictor for VC in CKD patients.

Previous studies reported elevated AGEs-sAF levels in CKD patients [30, 37, 38]. However, AGEs deposition likely begins in the early stages of renal disease because different CKD stages (i.e., CKD 3-4, HD and PD) exhibited the same AGEs-sAF levels. This result suggests that other factors, such as age and smoking, may exert a greater impact than the glomerular filtration rate *per se* prior to renal disease.

AGEs-sAF levels were an independent predictor for VC. An increase of 1 unit of AU of AGEs-sAF was associated with 3.5-fold increased odds of exhibiting linear VC. Other authors detected the same relationship using computed tomography to detect Ca deposits in coronary arteries from CKD 3-5 and HD patients but not PD patients [20, 39]. We also observed a direct relationship between cardiovascular risk as assessed using the Framingham score and AGEs-sAF levels.

AGEs and their receptor (RAGE) play an important role in the pathogenesis of vascular damage, especially in patients with DM and CKD [40]. A recent *in vivo* study demonstrated the association of AGEs accumulation in vessel tissues and medial arterial calcification severity in patients with end-stage kidney disease, but the exact mechanism is not understood [21].

1
2
3 The adequacy of DXA to evaluate osteoporosis in patients with CKD
4 was questioned recently. However, Marques *et al.* confirmed a significant
5 correlation between trabecular volume as assessed using bone biopsy and
6 DXA parameters in CKD patients [41]. The KDIGO CKD-MBD guideline
7 suggests the use of DXA to assess fracture risk in patients with CKD G3a–
8 G5D [42]. Therefore, this non-invasive instrument (AGE-Reader™) may be
9 useful for the evaluation of bone quality in this population.
10
11
12
13
14
15
16
17
18

19 The negative effects of AGEs on bone tissue were described
20 previously, and the association of AGEs with osteoporosis in patients without
21 CKD is known [43]. AGEs induce abnormal T-cell apoptosis *in vitro* [44], and
22 significant trabecular bone mass loss of the vertebrae and femur occurs in T-
23 cell deficient-mice [45]. The results of *in vitro* experiments demonstrated that
24 osteoclast bone resorption is enhanced with the addition of AGE-modified
25 albumin [38]. Clinical studies have demonstrated that patients with high serum
26 AGEs levels exhibit a high risk of osteoporosis [24, 46], but this finding was
27 not supported in our study.
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39

40 Notably, contradictory evidence indicates that serum levels of AGEs
41 may not reflect tissue levels of AGEs [47], and AGEs-sAF is a better marker
42 of tissue damage [30]. Serum CML levels or AGEs intake did not help
43 discriminate the presence of CV or bone loss in the present study.
44
45
46
47
48
49

50 Our study has some limitations, such as the relatively small sizes of the
51 groups. The generalizability of our findings to other groups is limited. We did
52 not perform bone histomorphometric studies to evaluate the impact of AGEs
53 on this tissue or possible mechanisms of interaction. However, the major
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

strength of this study was the simultaneous evaluation of patients in different stages of CKD (CKD 3-4, HD and PD) using a comprehensive assessment of AGEs-sAF levels, dietary AGEs intake and serum CML levels and their relationship with bone and CVD parameters and risk.

In summary, we demonstrated elevated AGEs-sAF levels in patients with different stages of CKD despite lower AGEs intake, and these levels were related to factors directly linked to morbidity and mortality in this population (i.e., VC and BMD). Further studies, including bone histomorphometry and immunohistochemistry, are needed to establish broader evidence of the role of AGEs-sAF using a non-invasive technique to predict bone loss and VC in CKD patients.

Conflict of Interest Statement: All authors declare that the results presented in this paper have not been published previously, in whole or part. Also, there are no personal conflicts of interest to disclose.

Acknowledgments: This research was supported by grants provided by São Paulo Research Foundation (FAPESP) number 2015/16.544-5 and FAEPEX-UNICAMP, number 519.294. The authors thank J. B. Lopes de Faria (Renal Pathophysiology Laboratory, Investigation on Diabetes Complications, School of Medical Sciences, University of Campinas, Campinas, Brazil) for providing the AGE-ReaderTM.

REFERENCES

1. Matias PJ, Ferreira C, Jorge C, *et al.* 25-Hydroxyvitamin D3, arterial calcifications and cardiovascular risk markers in haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant* 2009;24(2):611-618
2. Goldsmith D, Ritz E, Covic A. Vascular calcification: a stiff challenge for the nephrologist: does preventing bone disease cause arterial disease? *Kidney Int* 2004;66(4):1315-1333
3. Cannata-Andia JB, Rodriguez-Garcia M, Carrillo-Lopez N, *et al.* Vascular calcifications: pathogenesis, management, and impact on clinical outcomes. *J Am Soc Nephrol* 2006;17(12 Suppl 3):S267-273
4. Price PA, Roublick AM, Williamson MK. Artery calcification in uremic rats is increased by a low protein diet and prevented by treatment with ibandronate. *Kidney Int* 2006;70(9):1577-1583
5. London GM, Guerin AP, Marchais SJ, *et al.* Arterial media calcification in end-stage renal disease: impact on all-cause and cardiovascular mortality. *Nephrol Dial Transplant* 2003;18(9):1731-1740
6. Chen Z, Qureshi AR, Ripsweden J, *et al.* Vertebral bone density associates with coronary artery calcification and is an independent predictor of poor outcome in end-stage renal disease patients. *Bone* 2016;92:50-57
7. Cejka D, Weber M, Diarra D, *et al.* Inverse association between bone microarchitecture assessed by HR-pQCT and coronary artery calcification in patients with end-stage renal disease. *Bone* 2014;64:33-38
8. Watanabe R, Lemos MM, Carvalho AB, *et al.* The association between coronary artery calcification progression and loss of bone density in non-dialyzed CKD patients. *Clin Nephrol* 2012;78(6):425-431
9. Vanholder R, De Smet R, Glorieux G, *et al.* Review on uremic toxins: classification, concentration, and interindividual variability. *Kidney Int* 2003;63(5):1934-1943
10. Neiryck N, Glorieux G, Schepers E, *et al.* Review of protein-bound toxins, possibility for blood purification therapy. *Blood Purif* 2013;35 Suppl 1:45-50
11. Eble AS, Thorpe SR, Baynes JW. Nonenzymatic glucosylation and glucose-dependent cross-linking of protein. *J Biol Chem* 1983;258(15):9406-9412
12. Vlassara H. The AGE-receptor in the pathogenesis of diabetic complications. *Diabetes Metab Res Rev* 2001;17(6):436-443
13. Schmidt AM, Yan SD, Wautier JL, *et al.* Activation of receptor for advanced glycation end products: a mechanism for chronic vascular dysfunction in diabetic vasculopathy and atherosclerosis. *Circ Res* 1999;84(5):489-497
14. Massy ZA, Drueke TB. Vascular calcification. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2013;22(4):405-412
15. Shroff R, Long DA, Shanahan C. Mechanistic insights into vascular calcification in CKD. *J Am Soc Nephrol* 2013;24(2):179-189
16. Lutgers HL, Graaff R, de Vries R, *et al.* Carotid artery intima media thickness associates with skin autofluorescence in non-diabetic subjects without clinically manifest cardiovascular disease. *Eur J Clin Invest* 2010;40(9):812-817
17. den Dekker MA, Zwiers M, van den Heuvel ER, *et al.* Skin autofluorescence, a non-invasive marker for AGE accumulation, is associated with the degree of atherosclerosis. *PLoS One* 2013;8(12):e83084
18. Brodeur MR, Bouvet C, Bouchard S, *et al.* Reduction of advanced-glycation end products levels and inhibition of RAGE signaling decreases rat vascular calcification induced by diabetes. *PLoS One* 2014;9(1):e85922

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

19. Taki K, Takayama F, Tsuruta Y, *et al.* Oxidative stress, advanced glycation end product, and coronary artery calcification in hemodialysis patients. *Kidney Int* 2006;70(1):218-224

20. Wang AY, Wong CK, Yau YY, *et al.* Skin autofluorescence associates with vascular calcification in chronic kidney disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2014;34(8):1784-1790

21. Janda K, Krzanowski M, Gajda M, *et al.* Vascular effects of advanced glycation end-products: content of immunohistochemically detected AGEs in radial artery samples as a predictor for arterial calcification and cardiovascular risk in asymptomatic patients with chronic kidney disease. *Dis Markers* 2015;2015:153978

22. Fong Y, Edelstein D, Wang EA, *et al.* Inhibition of matrix-induced bone differentiation by advanced glycation end-products in rats. *Diabetologia* 1993;36(9):802-807

23. Yamamoto M, Sugimoto T. Advanced Glycation End Products, Diabetes, and Bone Strength. *Curr Osteoporos Rep* 2016;14(6):320-326

24. Yang DH, Chiang TI, Chang IC, *et al.* Increased levels of circulating advanced glycation end-products in menopausal women with osteoporosis. *Int J Med Sci* 2014;11(5):453-460

25. Notsu A. Advanced glycation end products inhibit the mineralization of mouse stromal ST2 cells by binding the receptor for ages and increasing TGF- β expression and secretion. *Endocrinology* 2014;155:2402-2410

26. Vlassara H, Cai W, Goodman S, *et al.* Protection against loss of innate defenses in adulthood by low advanced glycation end products (AGE) intake: role of the antiinflammatory AGE receptor-1. *J Clin Endocrinol Metab* 2009;94(11):4483-4491

27. Uribarri J, Woodruff S, Goodman S, *et al.* Advanced glycation end products in foods and a practical guide to their reduction in the diet. *J Am Diet Assoc* 2010;110(6):911-916 e912

28. Gerdemann A, Lemke HD, Nothdurft A, *et al.* Low-molecular but not high-molecular advanced glycation end products (AGEs) are removed by high-flux dialysis. *Clin Nephrol* 2000;54(4):276-283

29. Stein G, Franke S, Mahiout A, *et al.* Influence of dialysis modalities on serum AGE levels in end-stage renal disease patients. *Nephrol Dial Transplant* 2001;16(5):999-1008

30. Arsov S, Graaff R, van Oeveren W, *et al.* Advanced glycation end-products and skin autofluorescence in end-stage renal disease: a review. *Clin Chem Lab Med* 2014;52(1):11-20

31. Meerwaldt R, Hartog JW, Graaff R, *et al.* Skin autofluorescence, a measure of cumulative metabolic stress and advanced glycation end products, predicts mortality in hemodialysis patients. *J Am Soc Nephrol* 2005;16(12):3687-3693

32. Kannel WB, McGee D, Gordon T. A general cardiovascular risk profile: the Framingham Study. *Am J Cardiol* 1976;38(1):46-51

33. Koetsier M, Lutgers HL, de Jonge C, *et al.* Reference values of skin autofluorescence. *Diabetes Technol Ther* 2010;12(5):399-403

34. Honkanen E, Kauppila L, Wikstrom B, *et al.* Abdominal aortic calcification in dialysis patients: results of the CORD study. *Nephrol Dial Transplant* 2008;23(12):4009-4015

35. Adragao T, Pires A, Lucas C, *et al.* A simple vascular calcification score predicts cardiovascular risk in haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant* 2004;19(6):1480-1488

36. Aboyans V, Criqui MH, Abraham P, *et al.* Measurement and interpretation of the ankle-brachial index: a scientific statement from the American Heart Association. *Circulation* 2012;126(24):2890-2909

37. Tanaka K, Tani Y, Asai J, *et al.* Skin autofluorescence is associated with renal function and cardiovascular diseases in pre-dialysis chronic kidney disease patients. *Nephrol Dial Transplant* 2011;26(1):214-220

38. Miyata T, Wada Y, Cai Z, *et al.* Implication of an increased oxidative stress in the formation of advanced glycation end products in patients with end-stage renal failure. *Kidney Int* 1997;51(4):1170-1181

39. Hangai M, Takebe N, Honma H, *et al.* Association of Advanced Glycation End Products with coronary Artery Calcification in Japanese Subjects with Type 2 Diabetes as Assessed by Skin Autofluorescence. *J Atheroscler Thromb* 2016;23(10):1178-1187
40. Koyama H, Nishizawa Y. AGEs/RAGE in CKD: irreversible metabolic memory road toward CVD? *Eur J Clin Invest* 2010;40(7):623-635
41. Marques ID, Araujo MJ, Gracioli FG, *et al.* Biopsy vs. peripheral computed tomography to assess bone disease in CKD patients on dialysis: differences and similarities. *Osteoporos Int* 2017;28(5):1675-1683
42. Ketteler M, Block GA, Evenepoel P, *et al.* Executive summary of the 2017 KDIGO Chronic Kidney Disease-Mineral and Bone Disorder (CKD-MBD) Guideline Update: what's changed and why it matters. *Kidney Int* 2017;92(1):26-36
43. Yamagishi S. Role of advanced glycation end products (AGEs) in osteoporosis in diabetes. *Curr Drug Targets* 2011;12(14):2096-2102
44. Hung LF, Huang KY, Yang DH, *et al.* Advanced glycation end products induce T cell apoptosis: Involvement of oxidative stress, caspase and the mitochondrial pathway. *Mech Ageing Dev* 2010;131(11-12):682-691
45. Lee SK, Kadono Y, Okada F, *et al.* T lymphocyte-deficient mice lose trabecular bone mass with ovariectomy. *J Bone Miner Res* 2006;21(11):1704-1712
46. de Paula FJ, Horowitz MC, Rosen CJ. Novel insights into the relationship between diabetes and osteoporosis. *Diabetes Metab Res Rev* 2010;26(8):622-630
47. Ueno H, Koyama H, Fukumoto S, *et al.* Advanced glycation end products, carotid atherosclerosis, and circulating endothelial progenitor cells in patients with end-stage renal disease. *Metabolism* 2011;60(4):453-459

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Figure 1. Comparisons of mean AGEs-sAF levels between healthy subjects (Control group) and all CKD populations and subgroups.

For Peer Review

Table 1. Clinical and biochemistry findings of all CKD populations and subgroups.

For Peer Review

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Table 2. Biochemistry and imaging findings of all CKD populations and subgroups.

For Peer Review

Figure 2. AGEs-sAF levels were high in CKD patients with vascular calcification or reduced bone mineral density.

For Peer Review

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Figure 3. The linear relationship among AGEs-sAF levels, T-score (DXA) and cardiovascular risk (Framingham).

For Peer Review

Table 3. Multivariate stepwise linear regression for determinants of AGEs-sAF levels and logistic regression for determinants of vascular calcification.

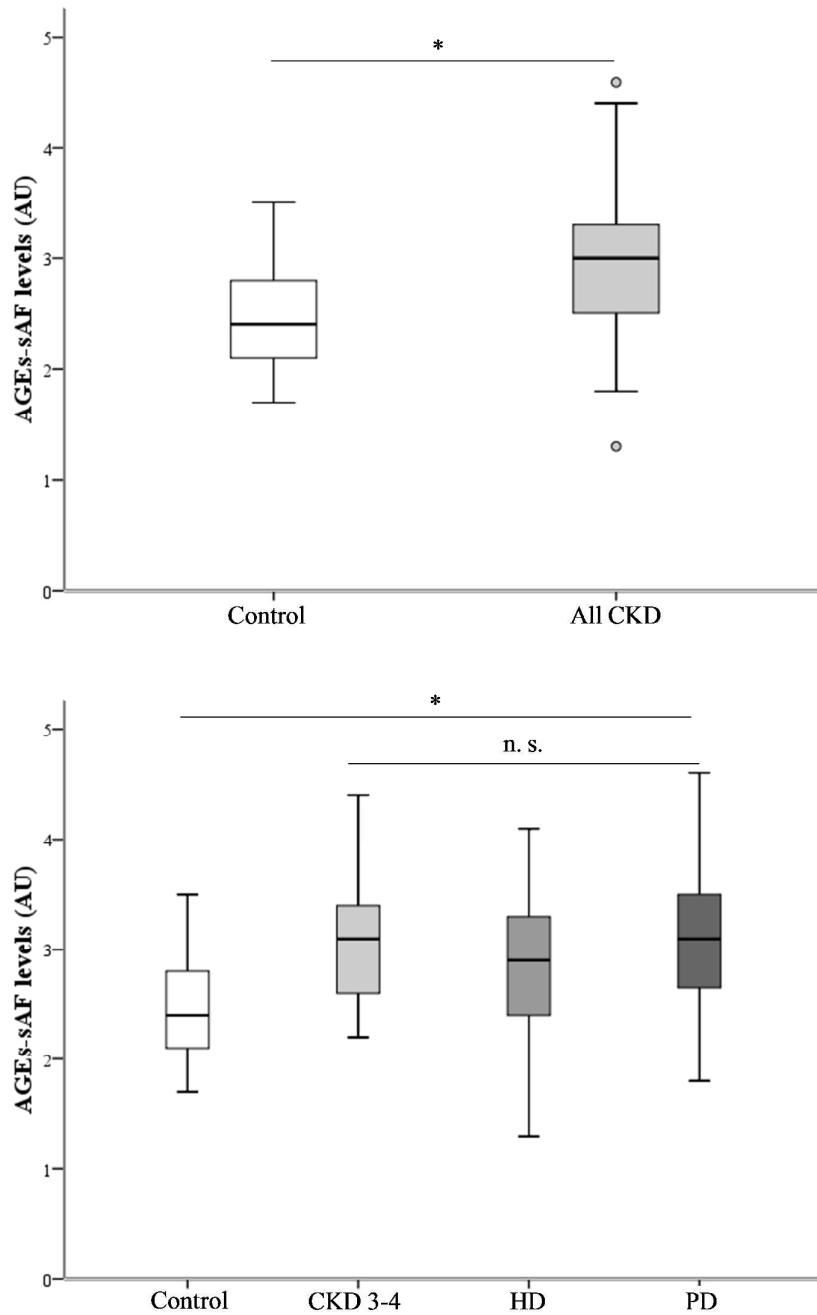
For Peer Review

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Figure 4. Examples of patients with different measurements of AGEs-sAF levels and the relationship with BMD (by DXA) and VC on X-ray plain film.

For Peer Review

Figure 1. Comparisons of mean AGEs-sAF levels between healthy subjects (Control group) and all CKD populations and subgroups.



*, $p = 0.001$ for control vs. CKD or vs. CKD 3-4, HD and PD; AGEs-sAF, advanced glycation end products measured using skin autofluorescence; CKD, chronic kidney disease; HD, hemodialysis; PD, peritoneal dialysis; n.s., not significant.

Table 1. Clinical and biochemistry findings of all CKD populations and subgroups.

Parameter	All CKD (N = 80)	CKD 3-4 (N = 20)	HD (N =32)	PD (N = 28)	p
Age (years)	50 ± 12	53 ± 10	48 ± 13	51 ± 13	0.46
Sex (female; N, %)	35 (44)	6 (30)	12 (37)	17 (61)	0.07
Ethnicity (Caucasian; N, %)	37 (46)	10 (50)	15 (47)	12 (43)	0.88
GFR (mL/min)	6 (5-16)	27 (16-35)*	5 (4-7)	5 (4-7)	0.0001
Body mass index (kg/m ²)	26 ± 5	28 ± 5*	25 ± 5	25 ± 4	0.02
Active or prior smoking (N, %)	25 (31)	2 (10)*	14 (44)	9 (32)	0.04
Comorbidities					
Hypertension (N, %)	70 (87)	17 (85)	28 (87)	25 (89)	0.9
Diabetes <i>mellitus</i> (N, %)	13 (16)	6 (30)	0 (0)	7 (25)	0.005
Atherosclerosis ^{''} (N, %)	15 (19)	1 (5)	6 (19)	8 (28)	0.1
Etiology of CKD (N, %)					0.25
Hypertension	22 (27)	8 (40)	11 (34)	3 (11)	
Glomerulonephritis	16 (20)	2 (10)	8 (25)	6 (21)	
Polycystic kidney disease	3 (4)	0 (0)	2 (6)	1 (4)	
Dialysis vintage (months)	21 (10-44)	NA	23 (10-68)	17 (10-30)	0.26
Hemoglobin (g/dL)	12 ± 2	14 ± 2*	12 ± 2	12 ± 1	0.0001
Glycemia (mg/dL)	84 (77-98)	94 (83-105)	81 (73-94)	83 (75-95)	0.06
C-reactive protein (mg/dL)	2.2 (0.9-5.2)	4.7 (1.3-9.4)	1.4 (0.6-3.7)	2.1 (0.9-4.8)	0.06
Triglycerides (mg/dL)	120 (82-159)	124 (83-139)	111 (75-160)	111 (85-211)	0.76
Total cholesterol (mg/dL)	142 ± 37	151 ± 26	124 ± 28 [#]	156 ± 46	0.002
LDL cholesterol (mg/dL)	73 (56- 99)	92 (74-107)	59 (48-72) [#]	88 (57-111)	0.001
Total calcium (mg/dL)	8.9 ± 0.8	9.1 ± 0.5	9.1 ± 0.7	8.4 ± 1 ^{&}	0.001
Phosphate (mg/dL)	5.1 ± 1.6	3.7 ± 0.9*	5.9 ± 1.8	5.3 ± 1	0.0001
Alkaline phosphatase (IU/L)	91 (71- 115)	79 (60-107)*	95 (72-134)	92 (72-104)	0.17
iPTH (pg/mL)	256 (136- 453)	133 (73-218)*	372 (187-874)	292 (184-536)	0.001
25-hydroxyvitamin D (ng/dL)	29 ± 10	31 ± 13	32 ± 9	24 ± 7 ^{&}	0.014

CKD, chronic kidney disease; HD, hemodialysis; PD, peritoneal dialysis; GFR, glomerular filtration rate; LDL, low density lipoprotein; iPTH, intact parathyroid hormone. ^{''}, history of acute myocardial infarct or stroke or peripheral vascular disease.

*, p < 0.05 for CKD 3-4 vs. HD and PD; #, p < 0.05 for HD vs. CKD 3-4 and PD; &, p < 0.05 for PD vs. CKD 3-4 and HD.

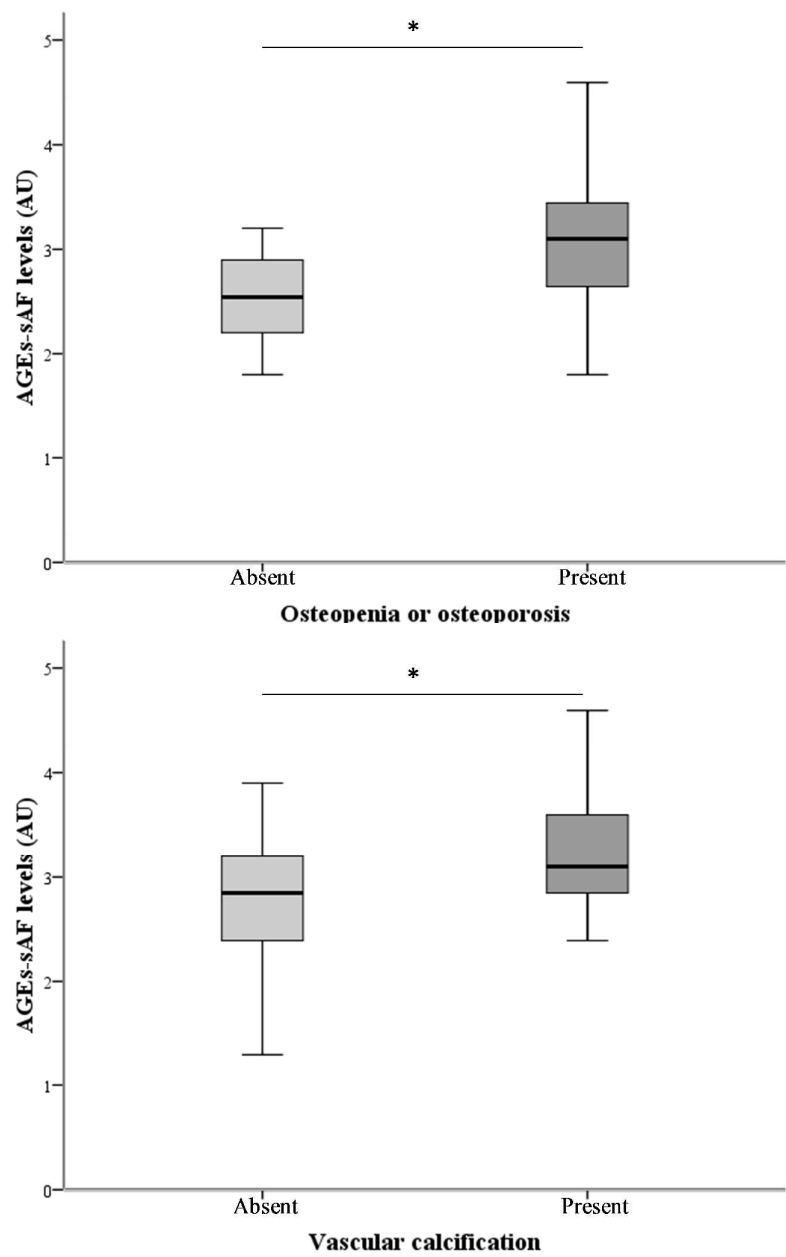
Table 2. Biochemistry and imaging findings of all CKD populations and subgroups.

Parameters	All CKD (N = 80)	CKD 3-4 (N = 20)	HD (N = 32)	PD (N = 28)	p-value
<i>AGEs related</i>					
AGEs-sAF (AU)	3.0 ± 0.6	3.0 ± 0.6	2.8 ± 0.6	3.0 ± 0.7	0.41
Serum CML (ng/mL)	15 (10-32)	10.3 (9.7-25.4)	13.2 (9-21.9)	24.7 (12.1-52.3) ^{&}	0.01
Glycated hemoglobin (%)	5.6 ± 1.0	5.9 ± 0.9	5.2 ± 0.5 [#]	5.9 ± 1.3	0.003
<i>AGEs intake</i>					
Total AGEs (kU/day)	9,518 ± 4,666	10,558 ± 5,684	8,564 ± 3,702	9,641 ± 4,688	0.41
Fraction CML (kU/day)	3,442 ± 2,980	3,790 ± 3,349	2,561 ± 1,792	3,942 ± 3,422	0.23
Fraction MG (nmol/day)	11,484 ± 6,284	10,488 ± 5,801	10,664 ± 5,480	12,778 ± 7,127	0.38
<i>Bone and cardiovascular related</i>					
T-score (DXA)	-1.8 ± 1	-1.9 ± 0.6	-1.5 ± 1.1	-1.9 ± 1.1	0.29
Osteoporosis (DXA) (N, %)	19 (27)	5 (25)	4 (17)	10 (37)	0.56
Vascular calcification (N, %)	25 (37)	6 (32)	10 (45)	9 (33)	0.58
Ankle-brachial index	1.1 (1-1.2)	1.08 ± 0.12	1.09 ± 0.19	1.07 ± 0.12	0.96
Framingham score	6 (2-9)	5 (0-7)	5 (2-7)	9 (3-12) ^{&}	0.01
Fraction of ejection (%)	67 ± 7	65 ± 4	70 ± 6 [#]	66 ± 7	0.029
Cardiac septum (mm)	10 (8-12)	9.0 (8-10)	11 (9-13) [#]	9 (8-11)	0.002
Left ventricular mass (g)	187 ± 60	162 ± 50	219 ± 54 [#]	166 ± 56	0.0001

CKD, chronic kidney disease; HD, hemodialysis; PD, peritoneal dialysis; AU, arbitrary unit; CML, carboxymethyllysine; MG, methylglyoxal; LDL, low density lipoprotein; HDL, high density lipoprotein; iPTH, intact parathyroid hormone; DXA, dual-energy X-ray absorptiometry.

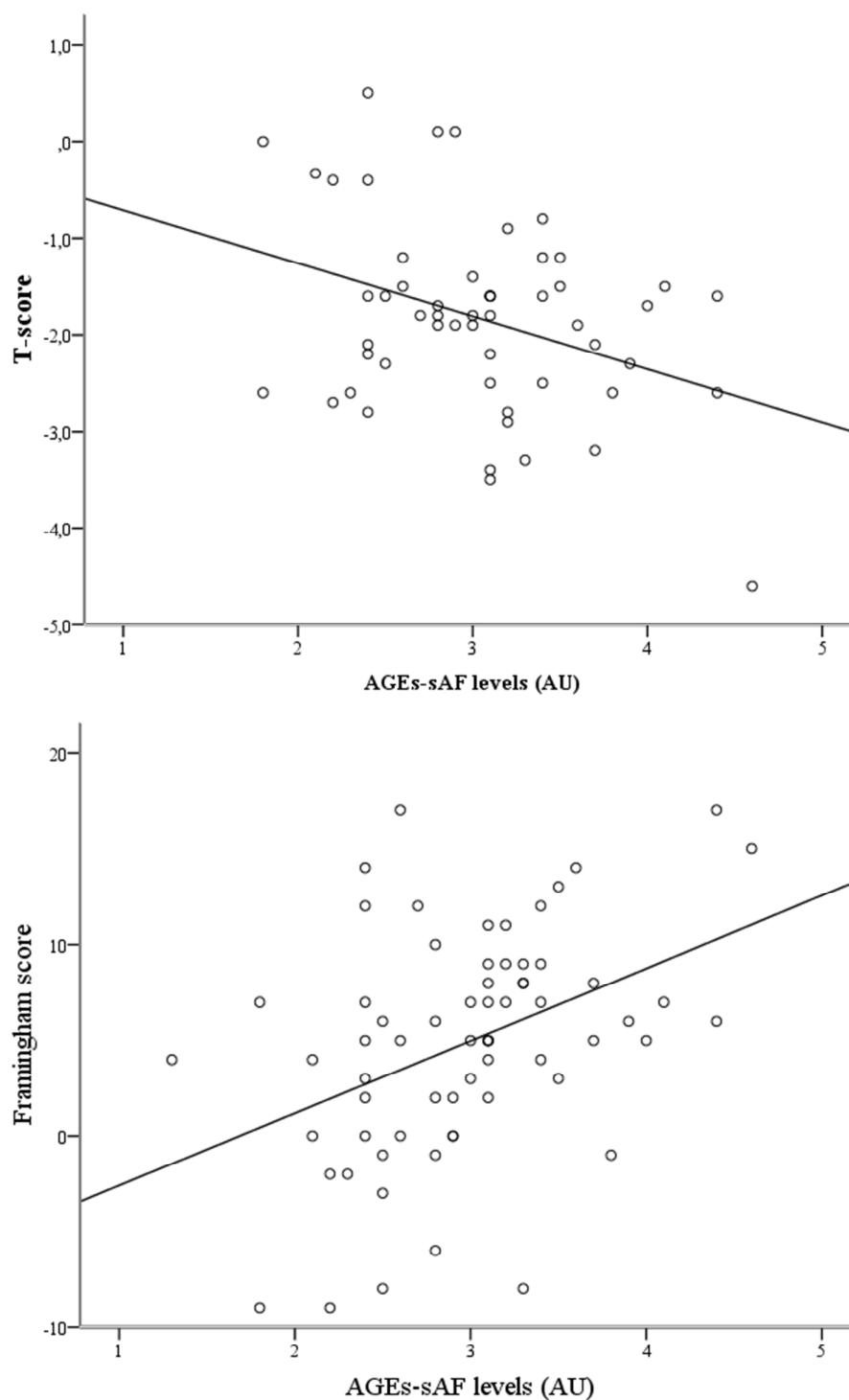
[#], p < 0.05 for HD vs. CKD 3-4 and PD; &, p < 0.05 for PD vs. CKD 3-4 and HD.

Figure 2. AGEs-sAF levels were high in CKD patients with vascular calcification or reduced bone mineral density.



*, p = 0.03.

Figure 3. The linear relationship among AGEs-sAF levels, T-score (DXA) and cardiovascular risk (Framingham).



For AGEs vs. T-score, $N = 53$; $R = -0.354$; and $p = 0.009$; for AGEs vs. Framingham score, $N = 65$; $R = 0.424$; and $p = 0.001$.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Table 3. Multivariate stepwise linear regression for determinants of AGEs-sAF levels and logistic regression for determinants of vascular calcification.

Items	P	OR	CI (95%)
<i>Determinants of AGEs-sAF</i>			
Age (+)	0.0002	-	-
Active or prior smoking (+)	0.03	-	-
<i>Determinants of vascular calcification</i>			
AGEs-sAF (+)	0.01	3.538	1.249-10.021
Age (+)	0.01	1.062	1.010-1.115
Body mass index (+)	0.02	1.148	1.021-1.291

For AGEs-sAF, N = 30; for vascular calcification, N = 57-68. +, direction of association. CI, confidence interval.

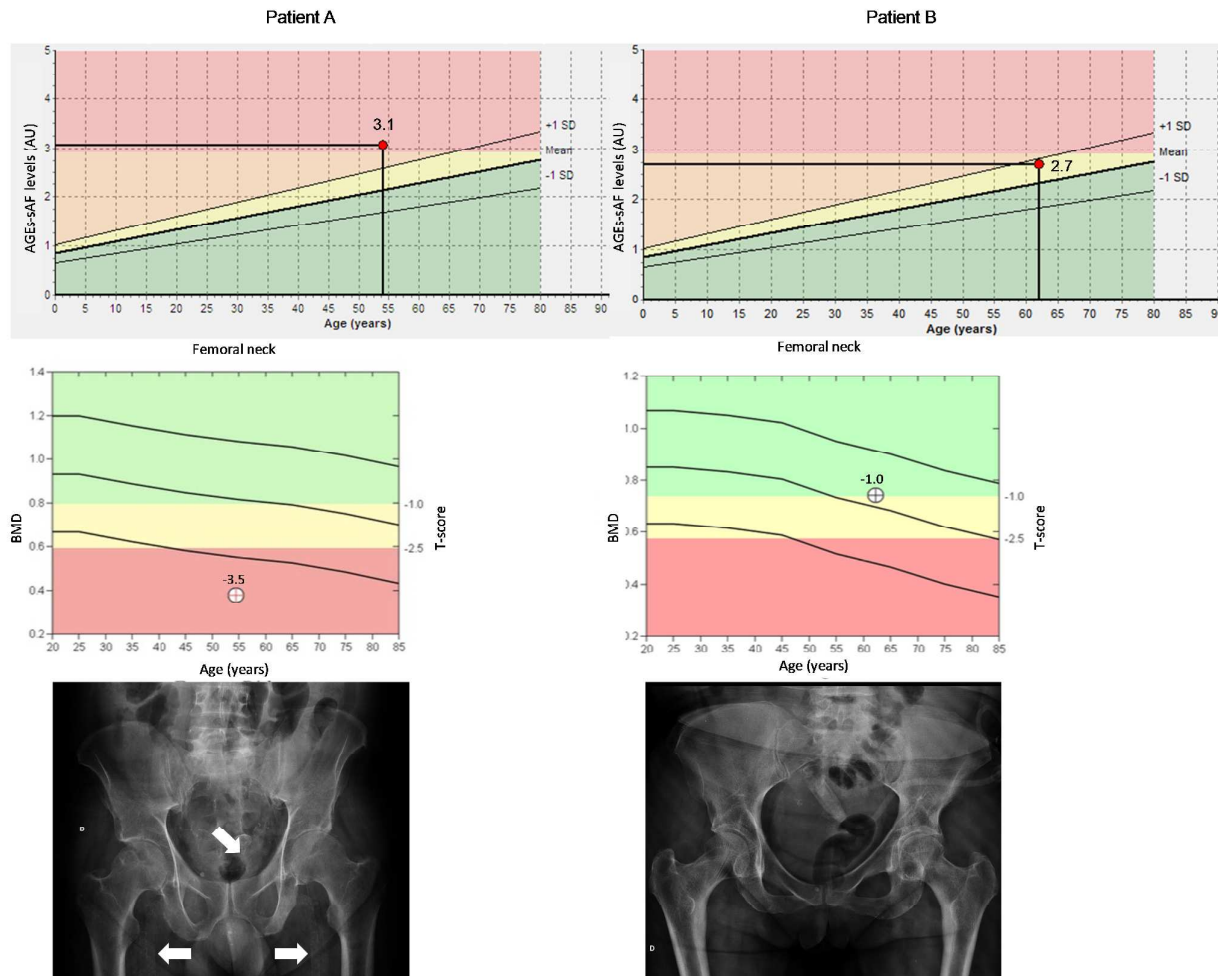


Figure 4. Examples of patients with different measurements of AGEs-sAF levels and the relationship with BMD (by DXA) and VC on X-ray plain film. In patient A, high AGEs-sAF levels, severe osteoporosis and extensive areas of VC were observed. In contrast, patient B presented with AGEs-sAF levels near the reference range, normal bone density and no areas of VC.

Patient A: male; 54 years; peritoneal dialysis vintage 12 months; presence of diabetes *mellitus*; no previous or active tabagism.

Patient B: female; 62 years; peritoneal dialysis vintage 43 months; no diabetes *mellitus*; no previous or active tabagism.

White arrows show severe vascular calcification areas; BMD, bone mineral density; DXA, dual-energy X-ray absorptiometry; AU, arbitrary units; VC, vascular calcification.